

CYP3A4-aktivitet *ex vivo* i individuelle humane intestinale mikrosomer

Anniken Oline Lilleengen



Mastergradsoppgave i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

CYP3A4-aktivitet *ex vivo* i individuelle humane intestinale mikrosomer

Anniken Oline Lilleengen



Mastergradsoppgave i farmasi

Oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere:

Professor Hege Christensen,

Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, UiO

Professor Anders Åsberg,

Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, UiO

© Anniken Oline Lilleengen

År 2014

Tittel: CYP3A4-aktivitet *ex-vivo* i individuelle humane intestinale mikrosomer

Forfatter: Anniken Oline Lilleengen

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

FORORD

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, under veiledning av professor Hege Christensen og professor Anders Åsberg. Arbeidet ble påbegynt august 2013 og avsluttet mai 2014.

Først og fremst vil jeg takke min supre veileder professor Hege Christensen. Med ditt smittende humør og gode løsninger kunne jeg ikke fått en bedre veileder. En tur inn på ditt kontor og dagen så mye lysere ut! Og selv om du har mye å gjøre, tar du deg alltid tid. Takk for din gode hjelp, støtte og ikke minst gode tilbakemeldinger gjennom hele masteroppgaven
© *Jeg vil også takke min veileder professor Anders Åsberg for gode innspill og faglige bidrag. Lykke til med syklingen i USA!*

En stor takk går også til overingeniør Siri Johannesen som har vært min store helt på lab. Det er ingenting denne dama ikke kan hjelpe med, Siri har alltid svaret. Takk for utrolig god hjelp og veiledning på lab, og for de fine gåturene opp og ned til FI. Jeg vil også takke resten av kinetikkgruppa for fine tirsdagsmøter og kaffepauser. Og ikke minst takk til alle her i fjerde etasje på Gydas. Selv om vi ikke er på FI lenger er vi fortsatt i FJERDE etasje ;) Dere har et unikt arbeidsmiljø og ikke minst, veldig trivelige lunsjer og kakefredager.

En spesiell takk går til studentene i Gydas for mye støtte, løs skravling, lange lunsjer og flere kaffepauser. Dere har gjort at dette året har blitt helt supert! Ellers så vil jeg takke alle mine medstudenter på Farmasøytisk Institutt. Det har vært 5 uforglemmelige år som jeg alltid vil huske. Og tilslutt vil jeg også takke venner og familie for støtte, oppmuntring og korrekturlesing, selv om ikke alt har vært like forståelig, og ikke minst Anders Bakken for hjelp med figurer og avkoblende fritidssysler.

Oslo, 12. mai 2014

Anniken Oline Lilleengen

FORKORTELSER

ABC-transportører	ATP-bindende kassett-transportører
ACN	Acetonitril
AUC	Areal under kurven
BMI	Body mass index
BSA	Bovint serumalbumin
CL_{int}	Intrinsic clearance
CV	Variasjonskoeffisient
CYP	Cytokrom P450
DIA	Diazepam
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
ESI	Elektronsprayionisasjon
FDA	U. S. Food and Drug Administration
GABA _A - reseptoren	Gamma-aminosmørsyre reseptor A
H ₂ SO ₄	Svovelsyre
HCOOH	Maursyre
Hepes	4-(2-hydoksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre
HLM	Humane lever mikrosomer
HIM	Humane intestinale mikrosomer
LC-MS	Væskeskromatografi-massespektrometri
$K_{-1,1,2}$	Hastighetskonstanter
K_m	Michaelis-Menten konstant
K_{si}	Hemmingskonstant

MDZ	Midazolam
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
m/z	Masse/ladning
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NH ₃	Ammoniakk
N ₂ -gass	Nitrogengass
P-gp	P-glykoprotein
r ²	Korrelasjonskoeffisient
S	Substratkonsentrasjon
SD	Standardavvik
SDS	Natrium dodekyl sulfat
SLC-transportører	Solute carrier-transportører
Trisma-base	Tris(hydroksymetyl)aminometan
v	Reaksjonshastighet for et enzym
V _{max}	Maksimal reaksjonshastighet for et enzym
1'-OH-MDZ	1'-hydroksy-midazolam
4-OH-MDZ	4-hydroksy-midazolam

SUMMARY

Introduction: Cytochrome P450 (CYP)-enzyme CYP3A4 is the most abundant CYP-enzyme expressed in the human liver and intestine, and it is responsible for the metabolism of over 50 % of all drugs. Results from a study in obese patients indicate an inverse association between body mass index (BMI) and the expression of CYP3A4 in intestine and liver. Obese patients with high BMI might therefore be at risk of being overexposed to several drugs, especially if the drug is dosed based on body weight. The aim of this master thesis was to develop a method to prepare microsomes by homogenization and further subcellular fractionation of human intestinal biopsies. Phenotyping of CYP3A4-activity was determined *ex vivo* in individual human intestinal microsomes (HIM) with use of midazolam (MDZ) as probe.

Method: Biopsies obtained from jejunum from one patient included in a previously preformed clinical trial was homogenized with either Potter-Elvehjem- or Dounce-homogenizer. The homogenate was centrifuged in two cycles in an ultracentrifuge. The final pellet, containing microsomes, was redissolved in 0.25 M sucrose and frozen at -70°C. In the metabolism studies microsomes and homogenates were preincubated at 37°C in 118 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7.4), 0.5 mM MgSO₄ and 1.6 mM NADPH for 5-10 minutes. MDZ was added in increasing concentrations (0.5-20 µM) and the samples were incubated for 7.5 minutes. The incubation was terminated by adding 150 µL ice-cold acetonitrile including internal standard and kept on ice for 30 minutes. The amount 1'-OH-MDZ formed was analysed by a validated liquid chromatography with mass spectrometry detection method. Enzyme kinetics analyses were estimated by Graphpad Prism version 5.

Results: The CYP3A4-activity was detected in both homogenates and microsomal fractions when using both Potter-Elvehjem- and Dounce-homogenizer. The formation of 1'-OH-MDZ increased with increasing amount of MDZ following the Michaelis-Menten model. The microsomes formed by Potter-Elvehjem-homogenizer showed less variability between the experiments than the microsomes formed by Dounce-homogenizer. This indicates that Potter-Elvehjem-homogenizer provides more reproducible results. Both homogenizing methods resulted in microsomal fractions with similar CL_{int}-values, and homogenate from the two methods showed also similar ability to metabolize MDZ. The microsomes formed by Potter-Elvehjem-homogenizer showed less variability between the experiments than the microsomes

formed by Dounce-homogenizer. The CYP3A4-activity was also detected in small biopsies, where Dounce-homogenizer was used for practical reasons. The enrichment in microsomal fractions relative to homogenates, indicate a higher specific activity in microsomal fractions. This was applied to the larger biopsies, corrected for both total protein and CYP3A4, while for the smaller biopsies this applied only by correction for total protein.

Conclusion: Methods have been developed for homogenizing intestinal biopsies from one obese patient and subsequently subcellular fraction of homogenates to microsomes for studying CYP3A4-activity. Both homogenizing methods resulted in similar CL_{int} -values for microsomal fractions and similar CL_{int} -values for homogenates and they are therefore suitable for homogenizing larger biopsies. When homogenizing smaller biopsies Dounce-homogenizer must be used, and the CYP3A4-activity should be determined directly in the homogenate. In clinical studies with small and large biopsies it is convenient to study the CYP3A4-activity in homogenates formed by Dounce-homogenizer.

SAMMENDRAG

Introduksjon: Cytokrom P450 (CYP)-enzymet CYP3A4 er det kvantitativt viktigste CYP-enzymet i lever og tarm og er ansvarlig for metabolisme av over 50 % av alle legemidler. Resultater fra en studie i sykkelig overvektige pasienter indikerer at det er en invers sammenheng mellom body mass index (BMI) og uttrykk av CYP3A4 i tarm og lever. Sykelig overvektige pasienter med ekstra høy BMI ser derfor ut til å ha økt risiko for overdosering av visse legemidler, spesielt hvis det doseres per kg kroppsvekt. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle en metode for å preparere mikrosomer fra tarmbiopsier, fra en pasient, ved hjelp av homogenisering og videre isolering ved hjelp av subcellulær fraksjonering. Fenotyping av CYP3A4-aktiviteten ble bestemt *ex vivo* i disse individuelle humane intestinale mikrosomene (HIM) ved bruk av midazolam (MDZ) som probe.

Metode: Biopsier fra jejunum fra en pasient inkludert i en tidligere klinisk studie ble homogenisert med Potter-Elvehjem- eller Dounce-homogenisator. Homogenatet ble sentrifugert i to omganger i ultrasentrifuge. Pelleten, som inneholdt mikrosomer, ble reløst i 0,25 M sukrosebuffer og fryst ned ved -70°C. I metabolismeforsøkene ble mikrosomer og homogenater (50 µL/rør) preinkubert ved 37°C i 118 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7,4), 0,5 mM MgSO₄ og 1,6 mM NADPH i 5-10 minutter. MDZ ble tilsatt i konsentrasjoner fra 0,5 til 20 µM, og prøvene ble inkubert i 7,5 minutter. Metabolismen ble terminert ved tilsetning av iskald acetonitril og inkubering på is i 30 minutter. Mengde 1-hydroksymidazolam (1'-OH-MDZ) dannet ble deretter bestemt ved en validert LC-MS metode. Enzymkinetiske analyser ble gjort ved hjelp av programvaren Graphpad Prism versjon 5.

Resultater: Det ble påvist CYP3A4-aktivitet i både homogenater og mikrosomfraksjoner ved bruk av både Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisering. Mengden 1'-OH-MDZ dannet i mikrosomene og homogenat økte med økende mengde MDZ ved Michaelis-Menten lignende forløp. Noen av forsøkene fikk en bedre tilpasning med ligningen som beskriver substrathemming. Dounce- og Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetodene ga mikrosomfraksjoner med tilsvarende CL_{int}-verdier, og homogenater fra de to metodene viste også tilsvarende evne til å metabolisere MDZ. Mikrosomfraksjonene dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator viste mindre variabilitet mellom forsøkene enn de som ble dannet ved Dounce-homogenisator. CYP3A4-aktivitet ble også påvist i mindre biopsier hvor Dounce-homogenisatoren ble benyttet på grunn av praktiske årsaker. Anrikningen i

mikrosomfraksjonene i forhold til homogenatene tyder på en høyere spesifikk aktivitet i mikrosomfraksjonen. Dette gjaldt for de store biopsiene korrigert for både totalprotein og CYP3A4, mens for de små biopsiene gjaldt det bare ved korrigering for totalprotein.

Konklusjon: Det er utviklet metoder for homogenisering av tarmbiopsier fra en sykkelig overvektig pasient og etterfølgende subcellulær fraksjonering av homogenat til mikrosomer, for måling av CYP3A4-aktivitet i disse. Begge homogeniseringsmetodene ga tilsvarende CL_{int} -verdier i mikrosomfraksjoner og tilsvarende CL_{int} -verdier i homogenat og er derfor egnet for homogenisering av store biopsier. Mikrosomfraksjonene ga høyere CL_{int} -verdier for metabolisme av MDZ, og disse vil være best egnet til å studere CYP3A4-aktiviteten i studier med tilgang på store biopsier. Ved homogenisering av små biopsier må Dounce-homogenisator benyttes, og CYP3A4-aktivitet bør bestemmes direkte i homogenat. I kliniske studier med små og store biopsier er det da hensiktsmessig å studere CYP3A4-aktivitet i homogenater dannet ved Dounce-homogenisator.

INNHALDSFORTEGNELSE

1	INNLEDNING.....	1
1.1	<i>Biotilgjengelighet</i>	1
1.2	<i>Cytokrom P450 enzymsystemet</i>	3
1.3	<i>CYP superfamilien.....</i>	5
1.4	<i>CYP3A underfamilien.....</i>	6
1.4.1	<i>CYP3A4.....</i>	7
1.4.2	<i>CYP3A5.....</i>	8
1.5	<i>Interindividuell variabilitet i legemiddelrespons</i>	8
1.6	<i>Enzymkinetikk.....</i>	9
1.6.1	<i>Michaelis-Menten kinetikk</i>	10
1.6.2	<i>Atypisk kinetikk</i>	12
1.7	<i>In vitro modeller for metabolismeforsk</i>	13
1.8	<i>Midazolam som probe</i>	14
1.8.1	<i>Farmakokinetikk</i>	14
1.9	<i>Cellefraksjonering.....</i>	15
1.9.1	<i>Homogenisering.....</i>	15
1.9.2	<i>Fraksjonering</i>	16
1.10	<i>LC-MS</i>	17
1.11	<i>Hensikten med oppgaven.....</i>	18
2	MATERIALER OG METODE	19
2.1	<i>Materialer.....</i>	19
2.1.1	<i>Kjemikaler, mikrosomer og biopsi</i>	19
2.1.2	<i>Utstyr</i>	20
2.1.3	<i>Løsninger</i>	21
2.2	<i>Metode.....</i>	23
2.2.1	<i>Homogenisering og fraksjonering</i>	23
2.2.2	<i>Metabolisme av MDZ som funksjon av substratkonsentrasjon.....</i>	24
2.2.3	<i>LC-MS</i>	25
2.2.4	<i>Proteinmåling.....</i>	26
2.2.5	<i>Western blott analyse.....</i>	26
2.3	<i>Databearbeidelse</i>	28
3	RESULTATER	29
3.1	<i>Kvantifisering av MDZ-metabolitter ved LC-MS.....</i>	29
3.2	<i>Kvantifisering av CYP3A4-uttrykk.....</i>	29
3.3	<i>Metabolismestudier med MDZ.....</i>	31
3.3.1	<i>Store biopsier.....</i>	31
3.3.2	<i>Små biopsier</i>	40
4	DISKUSJON.....	45
5	KONKLUSJON.....	50
	Litteraturliste	51
	Appendiks	55
	<i>Poster - Norsk selskap for Farmakologi og Toksikologi (NFST), Vintermøte Beitostølen 2014</i>	55

1 INNLEDNING

1.1 Biotilgjengelighet

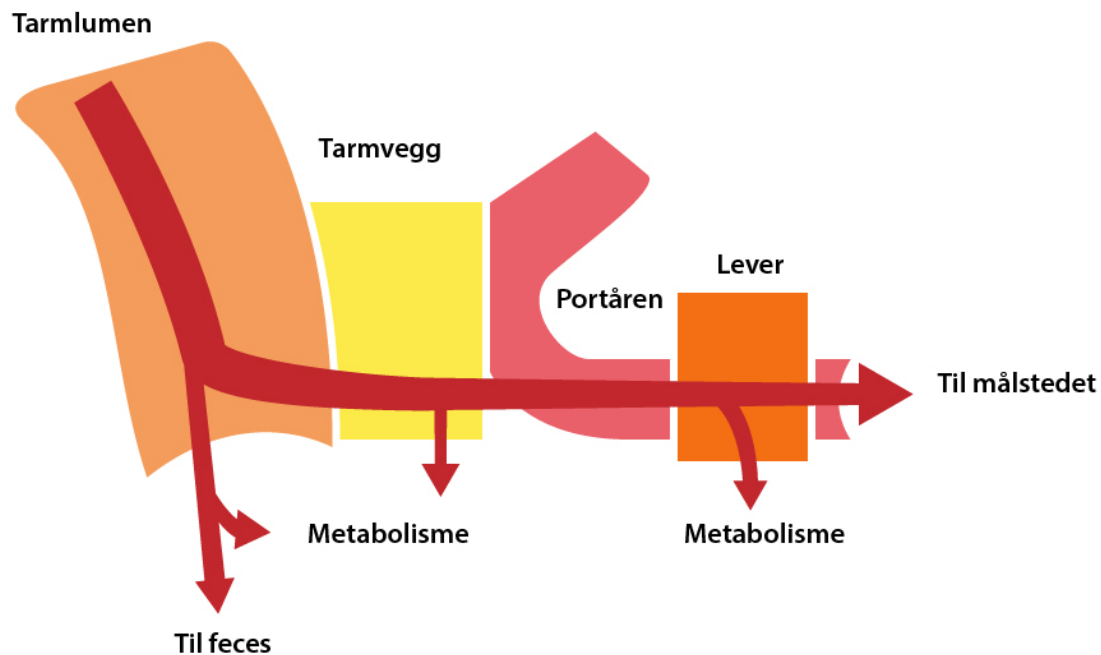
De fleste legemidler (over 70 %) administreres peroralt, og muligheten til å kunne forutsi hastighet og grad av absorpsjon av et oralt administrert legemiddel er avgjørende i forbindelse med legemiddelutvikling [1]. Ved en intravenøs administrasjon av et legemiddel, er man forsikret om at hele dosen når den systemiske sirkulasjonen og vil gi en effekt, men med peroralt administrerte legemidler er den systemiske eksponeringen begrenset av ulike faktorer. Biotilgjengelighet (F) angir hvor stor andel av inntatt dose som når den systemiske sirkulasjonen, og som dermed vil kunne gi en effekt [2].

Absorpsjon

Absorpsjon er legemidlets bevegelse fra administrasjonsstedet til den systemiske sirkulasjonen. Absorpsjonen fra mage-tarmkanalen påvirkes av faktorer som absorpsjonsareal, blodtilførsel til absorpsjonsstedet, legemidlets fysikalsk-kjemiske egenskaper (løsning, suspensjon, eller i fast doseringsform) og legemidlets konsentrasjon på absorpsjonsstedet. De fleste legemidler blir absorbert ved passiv diffusjon. Det foregår absorpsjon både i magesekk og tynntarm, men på grunn av stort overflateareal, lang kontakttid og god blodstrøm blir flest legemidler hovedsakelig absorbert i tynntarm [3].

Legemiddelmetabolisme

Legemidler blir utsatt for metabolisme i kroppen ved at det hydrofobe legemidlet blir omdannet til hydrofile metabolitter som deretter vil kunne bli utskilt via urin eller galle. Ved ekskresjon blir legemidlet eller dens metabolitter skilt ut av kroppen uforandret [4]. Legemiddelmetabolisme består av fase I- og fase II-reaksjoner. I fase I-reaksjoner er det enzymer som introduserer funksjonelle grupper på legemidlet, slik at det blir mer hydrofilt enten ved oksidasjon, reduksjon eller hydrolysereaksjoner [5]. Eksempel på slike funksjonelle grupper er $-OH$, $-COOH$, $-SH$, $-O-$ eller NH_2 . I de fleste tilfeller vil dette føre til en biodeaktivering, eller det kan føre til en bioaktivering når legemidlet er et prodrug. Ved fase II-reaksjoner bidrar enzymer til at det dannes konjugater av fase I-produktet. Dette fører til mer hydrofile metabolitter som dermed vil kunne elimineres fra kroppen [6].



Figur 1. Illustrasjonen viser de ulike barrierene som er involvert i legemidlets biotilgjengelighet. Dette gjelder for legemidler som administreres oralt. Modifisert figur fra Rowland and Tozer (2011).

Leveren er det organet hvor det finnes flest legemiddelmetaboliserende enzymer. I tillegg til lever er disse enzymene også lokalisert i gastrointestinal traktus, huden, lungene, nese slimhinner, nyre og øye [5]. For at et legemiddel skal nå den systemiske sirkulasjonen må det passere fra gastrointestinal lumen, gjennom tarmveggen og gjennom leveren (Figur 1). Legemidler som blir utsatt for metabolisme gjennom disse barrierene, får redusert mengde virkestoff som når den systemiske sirkulasjonen. Dette kalles førstepassasjemetabolisme [2]. Noe av legemidlet kan bli brutt ned allerede i tarmlumen. Den fraksjonen av inntatt dose som absorberes over tarmepitelet kalles F_F . I tarmen kan denne fraksjonen bli metabolisert. Fraksjonen som unnslipper metabolisme i tarmepitelet vil kunne bli transportert videre til lever (F_G). Legemidlet blir deretter metabolisert i lever, og F_H er den fraksjonen som unnslipper metabolismen. Den orale biotilgjengeligheten vil tilslutt være (ligning 1) [2]:

$$F = F_F \cdot F_G \cdot F_H$$

Legemiddeltransport

Transportører er membranproteiner som er tilstede i alle organismer. Disse proteinene kontrollerer influks av essensielle næringsstoffer og ioner, og effluks av cellulært avfall, miljøgifter og ulike legemidler [7]. Membrantransport er enten en passiv eller aktiv prosess.

Passive transportører transporterer substrater med en konsentrasjonsgradient, mens aktive transportører transporterer substrater mot en konsentrasjonsgradient. Membrantransportørene, som spiller en viktig rolle for transport av legemidler, blir delt inn i de to store superfamiliene, ABC (ATP-bindende kassett) og SLC (solute carrier) -transportører [8].

ABC-transportører er hovedsakelig uttrykt i lever, tarm, blod-hjerne-barrieren, placenta og nyrer. Transportørene i denne familien bruker energi, frigjort ved ATP-hydrolyse, til å transportere substratet over membranen inn eller ut av cellen [9]. De mest kjente transportørene i ABC-superfamilien er P-glykoprotein (P-gp) (den er kodet av genet *ABCB1*, også kalt *MDR1*) og CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator)-proteinet (kodet ved *ABCC7*) [7]. P-gp er en effluks-transportør og transporterer legemidler ut av cellen. Den uttrykkes i tarmepitelet og bidrar dermed til å redusere biotilgjengeligheten av ulike legemidler [10].

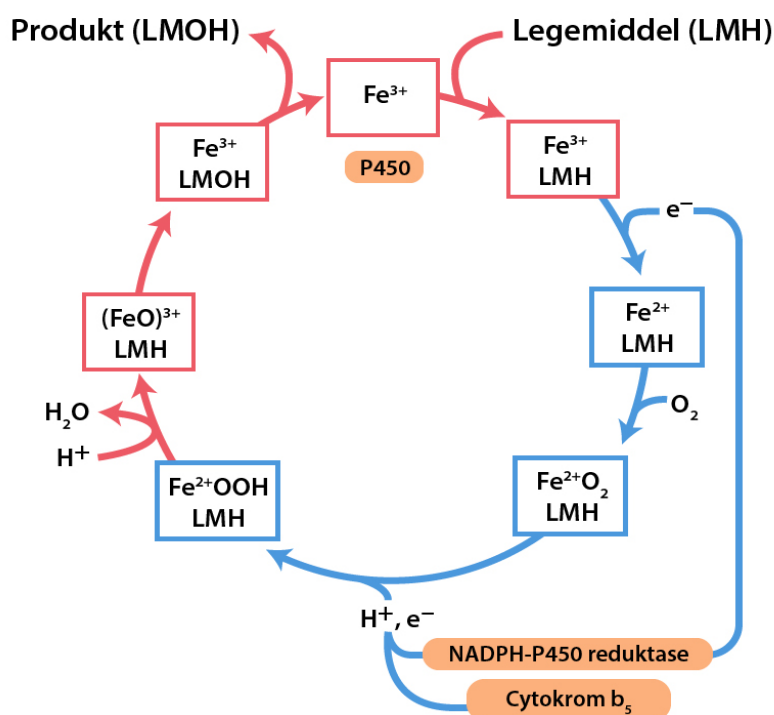
SLC superfamilien omfatter 55 subfamilier som har minst 362 funksjonelle gener [11]. En viktig subfamilie som er nøye undersøkt er organisk anion-transporterende polypeptid (OATP) familien [12]. Denne transportørfamilien er involvert i membranopptak av fysiologiske substrater og legemidler i kroppen. OATP1B1, som er spesielt uttrykt i lever, anses å ha spesiell betydning for legemiddeleliminasjon i lever. Denne transportøren spiller en viktig rolle i regulering av opptak av endogene substanser og legemidler i hepatocytter, og den gjør på denne måten legemidlet tilgjengelig for metabolisme av leverenzymmer som cytokrom P450 enzymer [12].

1.2 Cytokrom P450 enzymesystemet

Cytokrom P450 (CYP) enzymesystemet er det viktigste enzymesystemet som er involvert i legemiddelmetabolisme. I tillegg til å katalysere metabolisme av legemidler er enzymene også involvert i biosyntese av endogene forbindelser som steroider, fettsyrer, prostaglandiner og gallsalter [13, 14]. CYP-enzymmer er fase I-enzymmer og er lokalisert i endoplasmatisk retikulum (ER) i cellen. Det er per i dag beskrevet 57 funksjonelle CYP-enzymmer hvor 12 CYP-enzymmer i familien 1-3 er ansvarlig for metabolismen av legemidler [15]. Navnet til CYP-enzymene starter alltid med CYP, så kommer et tall som sier hvilken familie enzymet tilhører, deretter en bokstav som viser hvilken subfamilie enzymet tilhører og tilslutt et tall til

som angir CYP-isoenzymet. For eksempel, CYP3A4 tilhører familie 3, subfamilie A og gennummer 4 [6].

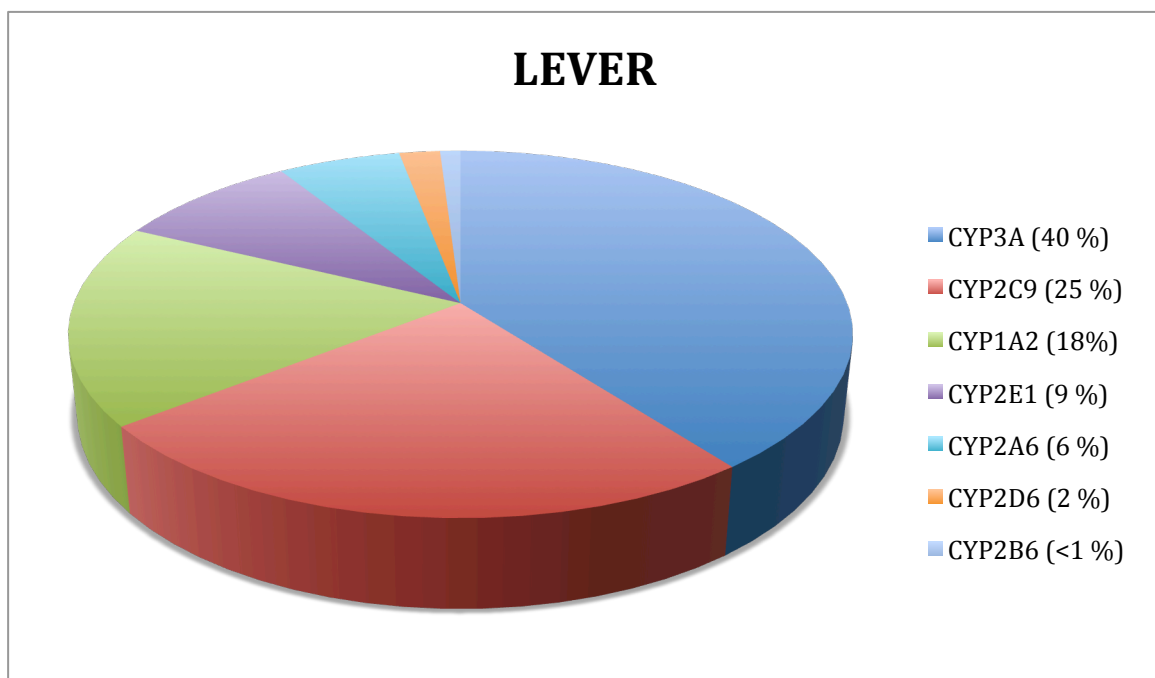
CYP-enzymene er hem-proteiner. Jern-atomet i heme-gruppen binder oksygen i det aktive setet på CYP-enzymet hvor oksidasjonen av substratet skjer. Enzymet NADPH-cytokrom P450 reduktase (NADPH-P450 reduktase) avgir elektroner for at oksidasjonen skal finne sted [6]. Legemidlet (LMH) binder seg til CYP-enzymets hemjern (Fe^{3+}) og danner et legemiddel-enzymkompleks (LMH-Fe^{3+}) (Figur 2). Bindingen av legemidlet til heme-gruppen fører til en konformasjonsendring i enzymet som gjør det lettere å redusere fra Fe^{3+} til Fe^{2+} . Reduseringen av komplekset utføres ved at NADPH-P450 reduktase overfører et elektron fra NADPH til komplekset. Videre bindes et molekylært oksygen til det reduserte legemiddel-enzymkomplekset og danner et nytt kompleks $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2\text{-LMH}$. Deretter overføres det et elektron og et proton til komplekset ($\text{Fe}^{2+}\text{O}_2\text{-LMH}$) via NADPH-P450 reduktase (eller alternativt fra cytokrom b_5) slik at vi får dannet komplekset $\text{Fe}^{2+}\text{OOH-LMH}$. Overførsel av enda et proton spalter komplekset ($\text{Fe}^{2+}\text{OOH-LMH}$) til vann og $\text{FeO}^{3+}\text{-LMH}$, for deretter å danne midlertidige frie radikaler: $\text{LM}\bullet$ og $\text{Fe}^{2+}\text{OH}\bullet$. Tilslutt binder $\text{LM}\bullet$ seg til $\text{OH}\bullet$ radikalet og danner et LMOH-produkt som frigjøres, og CYP-enzymet blir regenerert til sin opprinnelige tilstand [4].



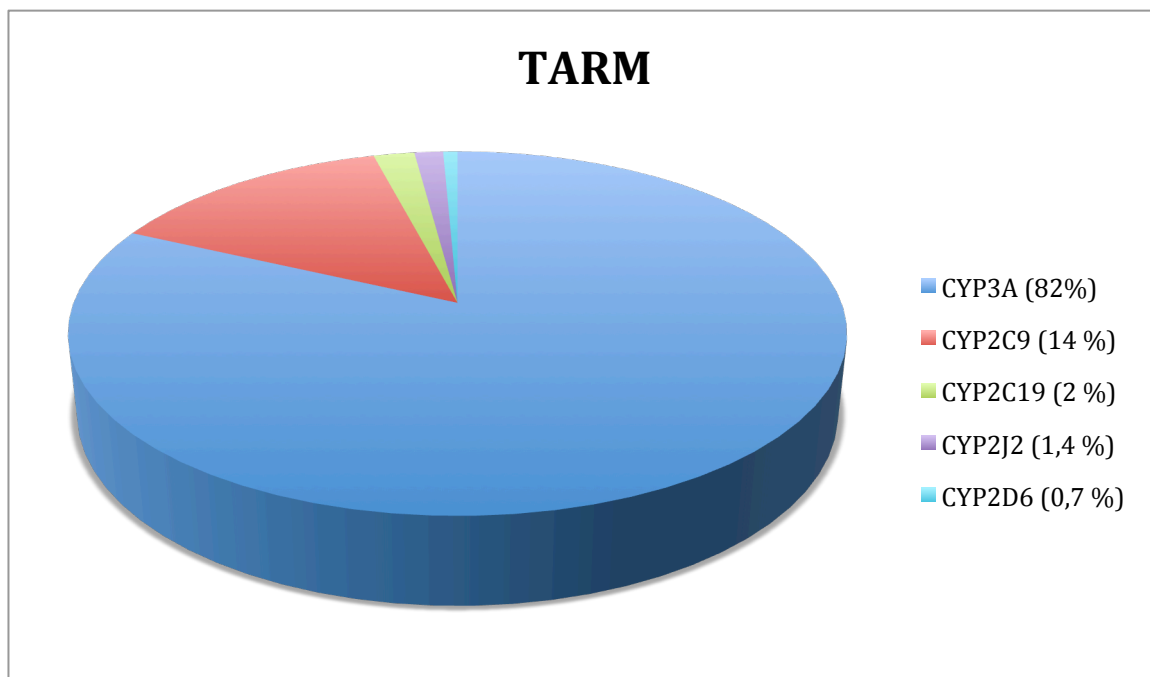
Figur 2. En illustrasjon av CYP-syklusen som viser hvordan legemidlet blir metabolisert. Modifisert figur fra Rang and Dale (2007).

1.3 CYP superfamilien

De viktigste CYP-subfamiliene for legemiddelmetabolisme er CYP2C, CYP2D og CYP3A. CYP1A, CYP1B, CYP2A, CYP2B og CYP2E subfamiliene er sjeldnere involvert i legemiddelmetabolisme, men de katalyserer metabolsk aktivering av mange protoksiner og prokarsinogener [6]. Leveren, som er det organet som er ansvarlig for store deler av metabolismen, inneholder størst mengde CYP-enzymmer hvor CYP3A utgjør en betydelig del (Figur 3). CYP2C9 og CYP1A2 utgjør også en stor del av andelen med henholdsvis 25 % og 18 %. I tarmen er det også CYP3A som utgjør den største delen av CYP-enzymene, men den totale andelen av legemiddelmetaboliserende enzymer er betydelig mindre i tarm enn i lever (Figur 4) [15].



Figur 3. Kvantitativ oversikt over CYP-enzymmer i lever. De prosentvise bidragene av de individuelle CYP-enzymene er basert på det totale immunkvantifiserte innholdet av CYP-enzymmer [16].



Figur 4. Kvantitativ oversikt over CYP-enzymmer i tarm. De prosentvise bidragene av de individuelle CYP-enzymene er basert på det totale immunkvantifiserte innholdet av CYP-enzymmer [15].

1.4 CYP3A underfamilien

CYP3A bidrar til metabolisme av flere legemidler og endogene forbindelser. Av de fire CYP3A genene som er indentifisert, er det bare CYP3A4 og CYP3A5 som uttrykkes i relevante mengder i lever hos voksne personer [17]. CYP3A4 er det enzymet det er mest av med 25 % av det totale CYP-innholdet i lever, og spiller en veldig viktig rolle i menneskets metabolisme. CYP3A5 er polymorft uttrykt, og er bare tilstede hos en fjerdedel av befolkningen [18]. CYP3A7 er hovedsakelig uttrykt hos fostre og blir nedregulert kort tid etter fødselen [19]. Hos noen voksne er CYP3A7 uttrykt i endometriet og i placenta [20]. Det nyeste identifiserte medlemmet til CYP3A-subfamilien, er isoenzymet CYP3A43. Gen-transkripsjon av CYP3A43 har blitt påvist i lever, nyre, prostata og bukspyttkjertelen, men nivået av mRNA i lever var mye lavere enn for CYP3A4. CYP3A43 vil sannsynligvis bidra i liten grad til systemisk clearance av legemidler eller andre xenobiotika. CYP3A5 og CYP3A4 har overlappende substratspesifisitet, og det er derfor ofte vanskelig å skille de relative bidragene til CYP3A-mediert metabolisme fra de to enzymene. Resultater fra andre studier har imidlertid indikert lavere bidrag fra CYP3A5 enn fra CYP3A4 for mange substrater [21].

1.4.1 CYP3A4

CYP3A4 er det kvantitativt viktigste CYP-enzymet i lever og tarm og er ansvarlig for metabolisme av over 50 % av alle legemidler [20]. Individuell variabilitet i CYP3A4-uttrykk og –aktivitet i både tarm og lever fører til stor variabilitet i systemisk legemiddeleksponering mellom pasienter og potensielt også innad i en pasient over tid [20, 22]. Det er rapportert 10-40 ganger variasjon i uttrykket av funksjonelt CYP3A4 hos voksne [19]. I en studie har det blitt funnet en 11 ganger variasjon i CYP3A4-uttrykket, en 6 ganger variasjon i katalytisk CYP3A-aktivitet og en 8 ganger variasjon i mRNA i intestinale biopsier [23]. Det er også funnet betydelig variabilitet i lever, hvor uttrykket av CYP3A4 og den katalytiske aktiviteten viste 10 ganger variasjon mellom pasientene [23]. Tidligere ble leveren sett på som viktigst i forhold til CYP3A førstepassasjemetabolisme på grunn av sin størrelse og det høye innholdet av CYP-enzym, mens man antok at tynntarm bidro i mindre grad på grunn av mindre innhold av CYP-enzym [22]. I den senere tid har studier i pasienter vist at både lever og tynntarm bidrar likt til førstepassasjemetabolisme av flere legemidler som for eksempel ciklosporin og midazolam [10, 13, 24]. Det er derfor vist at selv om innholdet av CYP3A-enzym i tarm er lavt i forhold til lever, er det tilstrekkelig til å omdanne en stor fraksjon av midazolam i løpet av passasjen gjennom tynntarm [13]. Dette er på grunn av den høye legemiddelkonsentrasjonen i enterocytene i absorpsjonsfasen og den relativt lave blodstrømmen i tarmen i forhold til leveren, som fører til forlenget eksponering til de metaboliserende enzymene i tarm [25].

Uttrykket av CYP3A varierer i ulike deler av tarmen. Det er høyest innhold i den proksimale delen og mengden avtar mot distale ileum [15]. Det har blitt utført flere studier med hensyn på å bestemme den katalytiske aktiviteten til CYP3A4 i tarm i forhold til i lever. Likevel er en entydig sammenligning av disse vanskelig på grunn av variabilitet i den delen av tarmen som har blitt benyttet, ulike enterocyt isoleringsmetoder, og observert interindividuell variabilitet i CYP3A4-uttrykk [26].

Det er rapportert at 90 % av variabiliteten til CYP3A4-aktiviteten i lever skyldes genetiske faktorer [27]. I den siste tiden er det derfor utført mye arbeid for å identifisere den genetiske variabiliteten i *CYP3A4*-genet [28]. De genetiske variabilitetene til *CYP3A4* kan, i motsetning til de andre CYP-enzymene, påvirke nivået eller funksjonen til CYP3A4-proteinet [21]. Et kjent *CYP3A4* variantallel er *CYP3A4*1B* [29]. Allelets funksjonelle betydning er fortsatt

uklar. Data fra noen *in vitro*-studier viser at *CYP3A4*1B* er forbundet med en økt transkripsjonsaktivitet i promotorregionen. *CYP3A4*22* er det nyeste variantallelet og ble først beskrevet i 2011 [29]. Dette allelet er rapportert å være assosiert med redusert CYP3A4-uttrykk og -aktivitet i lever og kan dermed være med på å forklare noe av den interindividuelle forskjellen i dose-respons som er observert ved legemidler som metaboliseres av CYP3A4 [29].

1.4.2 CYP3A5

CYP3A5 er hyppigere uttrykt i lever hos afrikanske amerikanere (60 %) enn hos den kaukasiske populasjonen (33 %) [19]. *CYP3A5* er polymorft med et variantallel, *CYP3A5*3*, en variant som fører til fravær av aktivt CYP3A5-enzym [17]. Bare de som uttrykker minst ett *CYP3A5*1* allel uttrykker store mengder CYP3A5. Enzymet representerer minst 50 % av det totale hepatiske CYP3A innholdet i mennesker som uttrykker aktivt CYP3A5 [19]. Enzymet vil derfor være det viktigste genetiske bidraget til interindividuelle forskjeller i legemiddelrespons for CYP3A subfamilien [19, 30]. Uttrykket av *CYP3A5* har vist å ha signifikant påvirkning på systemiske eksponering av ulike legemidler som statiner, immunsuppressiva og noen benzodiazepiner [17].

1.5 Interindividuell variabilitet i legemiddelrespons

Interindividuell variabilitet i legemiddelmetabolisme er en utfordring i legemiddelbehandling. Genetikk er som nevnt en viktig faktor som fører til interindividuell variabilitet med hensyn til legemiddelmetabolisme [18]. Samtidig er det den faktoren som er mest uforutsigbar [2]. Mutasjoner i genet til et metaboliserende enzym kan resultere i enzymvarianter med høyere, lavere eller ingen aktivitet. CYP-enzymene som utviser genetisk polymorfisme som er av anerkjent klinisk betydning er *CYP2D6*, *CYP2C9* og *CYP2C19* [31]. Omlag 80 % av legemidler i bruk i dag blir metabolisert via disse enzymene [31]. CYP2D6 polymorfisme er den mest studerte genetisk polymorfisme i legemiddelmetabolisme [18, 32]. Omtrent 5-14 % kaukasiske, 0-5 % afrikanere og 0,1 % av asiater mangler CYP2D6-aktivitet, og disse personene blir derfor betraktet som langsomme metabolisører (poor metabolizer) [31]. CYP2D6-aktivitet varierer fra langsomme metabolisører til ultra-hurtige metabolisører (ultra-rapid metabolizer) og uttrykket til enzymet er påvirket av minst 18 kjente alleler [33]. Konsekvensene av de ulike fenotypene til CYP2D6 er henholdsvis økt risiko for toksisitet og terapivikt [34]. CYP2C9 er også et klinisk relevant enzym som viser flere genetiske

varianter som potensielt vil ha innvirkning på effekt og bivirkninger av legemidler som blir metabolisert av dette enzymet [31].

Andre faktorer som gir interindividuell variabilitet i forhold til legemiddelmetabolisme er sykdom, alder, kjønn, kroppsvekt og miljøfaktorer. Alder, vekt og sykdom og samtidig administrering av legemidler er viktige faktorer, fordi det er variable parametre som kan måles og tas høyde for. Kjønnforskjeller i hormonbalanse, kroppssammensetning, og aktivitet av ulike enzymer er åpenbare forskjeller som gir ulik farmakokinetikk og legemiddelrespons, men det har vist seg at det er liten forskjell i evnen til å metabolisere legemidler mellom kjønn [2].

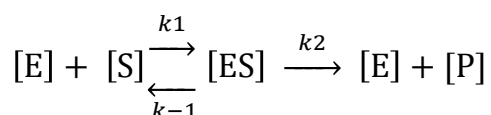
Resultater fra en studie i sykkelig overvektige pasienter indikerer at det er en invers sammenheng mellom body mass index (BMI) og uttrykk av CYP3A4 i tarm og lever, og det ble også funnet en invers sammenheng mellom BMI og oral clearance av atorvastatin lakton i disse pasientene [35]. Hypotesen er dermed at det er en nedsatt CYP3A4-aktivitet som følge av nedsatt uttrykk av CYP3A4. Mekanismen for dette er ikke klarlagt, men pasientenes inflammatoriske tilstand kan være involvert, siden cytokinaktivitet har vist seg å føre til nedregulering av CYP3A4 [36]. Sykelig overvektige pasienter med ekstra høy BMI ser derfor ut til å ha økt risiko for overdosering av visse legemidler, spesielt hvis det doseres per kg kroppsvekt [35].

1.6 Enzymkinetikk

Ved legemiddelutvikling er det en fordel å bruke *in vitro* data til å predikere de farmakokinetiske egenskaper *in vivo*. Slike såkalte *in vitro-in vivo* –korrelasjoner kan anvendes til blant annet å bestemme farmakokinetiske egenskaper, finne potensialet for legemiddelinteraksjoner og i tillegg finne ut om genotypisk og fenotypisk variabilitet i populasjonen vil påvirke legemiddelsubstansen [37]. Bestemmelse av kinetiske parametre fra *in vitro* data kan for eksempel forutsi om et enzym vil delta i metabolismen av legemidlet ved de legemiddelkonsentrasjoner som er relevante *in vivo* [38].

1.6.1 Michaelis-Menten kinetikk

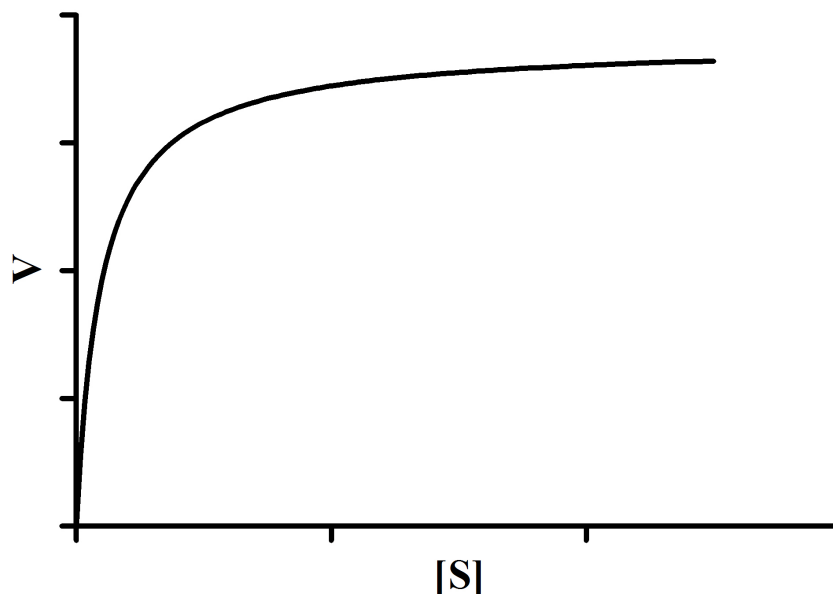
Enzymkinetikk er en kvantitativ beskrivelse av enzymkatalyserte reaksjoner. Ved bruk av enzymkinetiske modeller kan de ulike parametrene bli estimert. Enzymkatalyserte reaksjoner kan beskrives ved følgende ligning (ligning 2) [13]:



Substratet [S] binder seg til enzymet [E] og danner et enzymsubstrat-kompleks [ES], ved hjelp av hastighetskonstanten k_1 . Deretter kan reaksjonen gå to veier. Enten vil reaksjonen dissosiere tilbake til utgangspunktet via hastighetskonstanten k_{-1} , eller så vil reaksjonen gå videre via den katalytiske hastighetskonstanten (k_2) og danne et produkt (den dannende metabolitt) og frigjøre enzymet [13]. De fleste legemidler, som blir metabolisert, kan beskrives ut ifra Michaelis-Menten kinetikk [39]. Hastigheten (v) til en reaksjon kan bestemmes ved Michaelis-Menten ligning (ligning 3):

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

hvor V_{max} er maksimum hastighet for metabolismen, K_m er Michaelis-Menten konstanten som sier noe om substratets affinitet til enzymet og [S] er substratkonsentrasjonen. K_m beskriver substratkonsentrasjonen som gir halvparten av den maksimale reaksjonshastigheten (V_{max}) [40]. Michaelis-Menten kinetikk følger en hyperbolsk kurve (Figur 5). Graden av produktdannelse øker sterkt ved lave substratkonsentrasjoner, men når substratkonsentrasjonen øker, blir enzymet i inkubasjonsblandingen mettet og hastigheten til reaksjonen har nådd den maksimale hastighet (V_{max}) [38].



Figur 5. Grafen fremstiller et hypotetisk legemiddel som følger Michaelis-Menten kinetikk og gir en hyperbolsk kurve.

Enzymkinetisk modellering ved legemiddelmetabolismeforsøk *in vitro* vil forenkle utvikling av legemidler ved at ulike kinetiske parametre blir estimert. Estimeringen av slike parametre kan føre til en beslutning om legemiddelutviklingen skal fortsette [38]. For å kunne ekstrapolere enzymkinetiske data funnet *in vitro* til metabolsk aktivitet *in vivo*, brukes intrinsic clearance (CL_{int}). CL_{int} er definert som hastigheten (v) av den enzymatiske reaksjonen dividert med substratkonsentrasjonen $[S]$ og er et uttrykk for enzymets evne til å metabolisere et legemiddel. CL_{int} kan bli beskrevet slik, gitt at ingen hemmere er tilstede (ligning 4):

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m + [S]}$$

For de fleste legemidler er konsentrasjonen *in vivo* vesentlig lavere enn K_m ($[S] \ll K_m$), og følgelig kan ligningen for CL_{int} forenkles til (ligning 5) [40]:

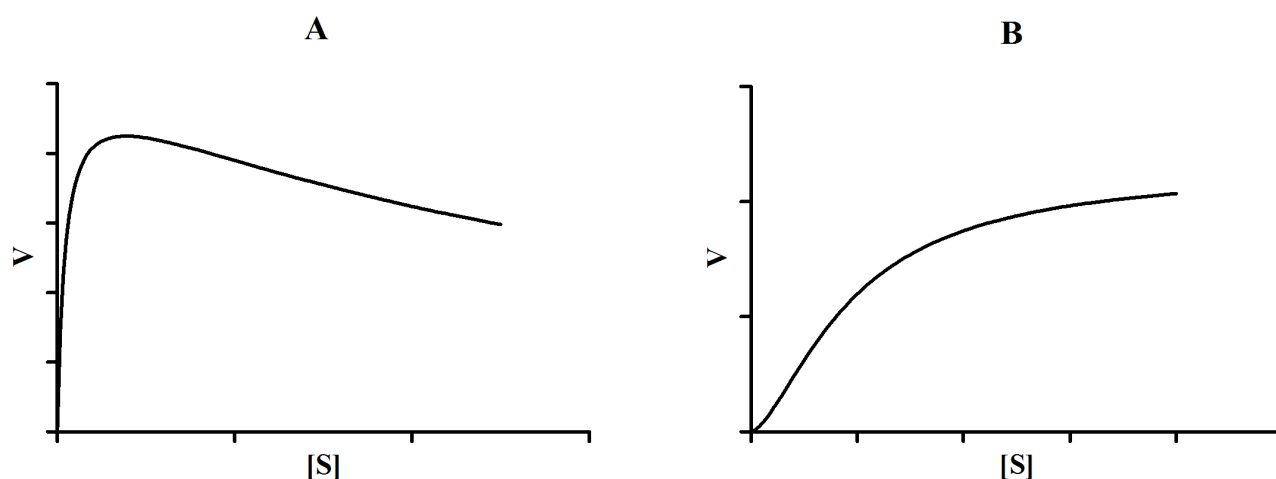
$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

Tradisjonelt har metabolittdannelsesmetoden blitt brukt for å kunne estimere *in vitro* CL_{int} . I denne metoden måles hastigheten for dannelsen av metabolittene ved ulike konsentrasjoner.

For å gi samsvar med Michaelis-Menten ligningen, som forutsetter mindre enn 10 % substrat forbruk, bruker man korte inkubasjonstider og lave enzymkonsentrasjoner i studiene [41].

1.6.2 Atypisk kinetikk

Mange legemidler uttrykker Michaelis-Menten lignende kinetikk *in vitro*, men det er ikke alltid tilfellet [39]. For noen legemidler er den kinetiske profilen bedre beskrevet av ikke Michaelis-Menten kinetikk eller atypisk kinetikk. Det enzymet som er mest kjent for å være assosiert med atypisk kinetikk er CYP3A4. Det store aktive setet til CYP3A4 tillater tilstedeværelse av minst to molekyler samtidig. Den eksakte bindingskonformasjonen er avhengig av substratet som er involvert, den relative konsentrasjonen og affiniteten for enzymet [42]. Atypisk enzymkinetikk inkluderer flere ulike profiler, blant annet substrathemming og autoaktivering. Ved substrathemming blir det aktive setet okkupert av to molekyler av samme substrat, hvor det ene molekylet er produktivt, mens det andre er hemmende. Dette resulterer i minkende metabolismehastighet med økende konsentrasjon (Figur 6A). Autoaktivering oppstår ved at molekyler fra samme substrat okkuperer det aktive setet og dermed kan aktivere sin egen metabolisme, noe som vil resultere i et sigmoidal kinetikk forløp (Figur 6B). CYP-aktiviteten vil dermed øke i et substratkonsentrasjon avhengig forløp [39, 42].



Figur 6. Kurve A viser metabolisme av et hypotetisk legemiddel som følger en konveks kurve, hvor kurveforløpet har en substrathemmings kinetikk profil. I kurve B følger metabolismen en sigmoidal kurve, hvor forsinkelsen i starten av kurven skyldes autoaktivering.

Substrathemming anses å være lignende ikke-kompetitiv hemming, som er en type hemmingsmekanisme. Denne beskrives ut fra denne ligningen (ligning 6) [40]:

$$v = \frac{V_{max}}{(1 + (\frac{K_m}{S}) + (\frac{S}{K_{si}}))}$$

hvor K_{si} er en konstant som beskriver graden av substrathemming. En mer kjent kinetikk modell som blir brukt for å beskrive sigmoidal kinetisk profil er Hill ligningen (ligning 7):

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^n}{K_m^n + [S]^n}$$

hvor K_m er substratkonsentrasjonen som gir halvparten av V_{max} og er analog til K_m i Michaelis-Menten-ligningen og n er Hill koeffisienten som beskriver grad av sigmoiditet. K_m^n er ikke tilsvarende K_m (med mindre $n = 1$) [38, 40].

1.7 *In vitro* modeller for metabolismeforsøk

In vitro modeller er mye brukt for å kunne karakterisere metabolismen til et legemiddel og kunne forutsi potensielle legemiddelinteraksjoner. Modellene blir også brukt til å predikere metabolsk clearance kvantitativt, i for eksempel lever [43]. *In vitro* modeller er også kostnads- og tidseffektive. Modeller som blir brukt i *in vitro* metabolismestudier er rekombinante enzymsystemer, mikrosomer, hepatocytter og vevsprøver fra lever [44].

Rekombinante enzymsystemer er den enkleste *in vitro* modellen. Den inneholder individuelle humane enzymer som vanligvis er produsert i ER av den eukaryote vertscellen. Den største fordelen med denne modellen er at den er enkel og den gir en mulighet til å studere aktiviteten til et enkelt legemiddelmetaboliserende enzym [44].

Mikrosomer er vesikler fra ER som dannes ved homogenisering av vev og påfølgende subcellulær fraksjonering ved hjelp av en ultrasentrifuge [44, 45]. Humane levermikrosomer (HLM) er mye brukt i studier av legemiddelmetabolisme [46]. Grunnen til dette er at mikrosomene inneholder nesten bare CYP- og UGT-enzymmer og vil derfor gi et godt bilde av metabolismen til disse enzymene [45]. I tillegg er modellen billig og enkel å bruke. Humane

intestinale mikrosomer (HIM) blir benyttet for å studere legemiddelmetabolisme i tarmceller [26].

Bruk av hepatocytter til å studere legemiddelmetabolisme *in vitro* har flere fordeler. Det er blant annet mulig å studere både fase I- og fase II-metabolismeveier i tillegg til å identifisere substanser som regulerer uttrykket og aktiviteten til enzymene som er involvert i legemiddelmetabolisme. Hepatocytter er også nyttig for å kunne identifisere toksiske metabolitter [46].

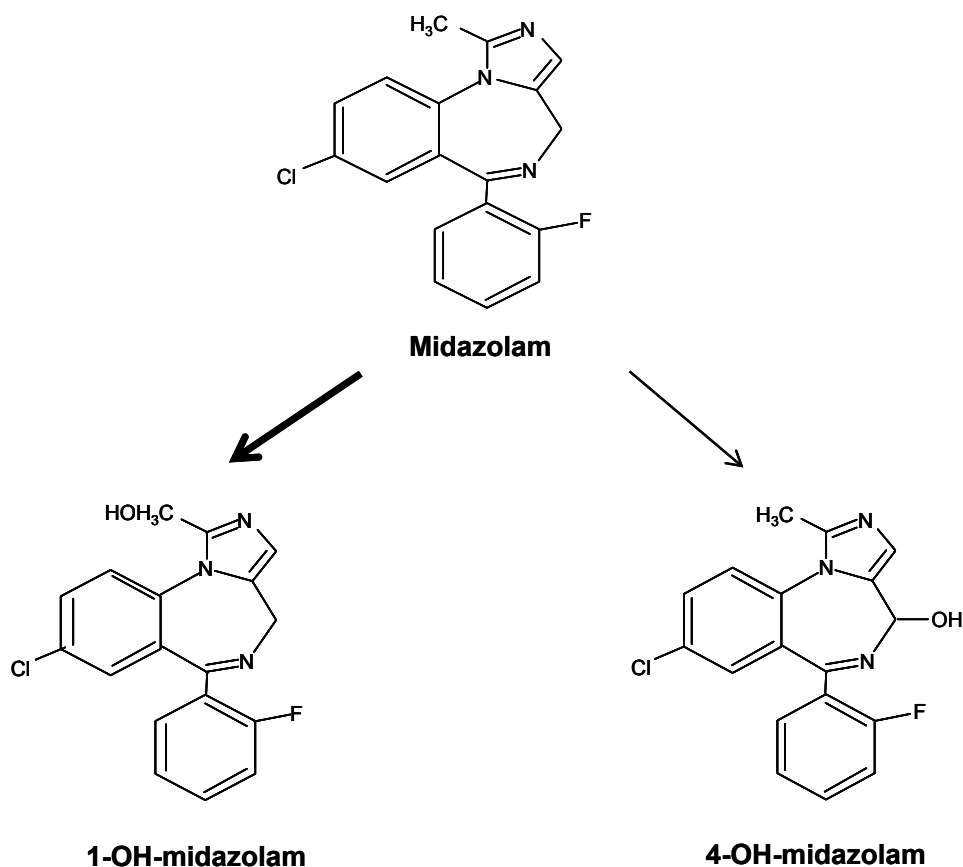
Vevsprøver fra lever er et mer komplekst system, og har potensiale til å representere metabolisme *in vivo* i større grad enn hepatocytter. Ulempene her er at det er begrenset tilgjengelighet, donorvariabilitet og at det krever spesialutstyr [46].

1.8 Midazolam som probe

Midazolam (MDZ) er et korttidsvirkende benzodiazepin og gir effekter som hypnose, angstdemping, sedasjon, krampeløsning og avslapping av skjelettmuskulatur. Legemidlet blir hovedsakelig brukt som krampestillende og som intravenøst anestesimiddel [47]. Benzodiazepiner og MDZ virker ved å binde seg direkte til et bestemt område på GABA_A-reseptoren (gamma-aminosmørsyre reseptor A) som er forskjellig fra GABA-bindingssetet. MDZ aktiverer ikke GABA_A-reseptoren direkte, den opptrer allosterisk og modulerer dermed effekten til GABA [48].

1.8.1 Farmakokinetikk

MDZ blir hovedsakelig metabolisert via CYP3A til hovedmetabolitten 1'-hydroksymidazolam (1'-OH-MDZ) og til den sekundære-metabolitten 4-hydroksymidazolam (4-OH-MDZ) som er farmakologisk aktive metabolitter (Figur 7) [49]. Videre blir metabolittene glukuronidert og skilt ut via nyrene. MDZ er foretrukket modellsubstrat for *in vivo*-testing av blant annet amerikanske Food and Drug Administration (FDA). Legemidlets korte halveringstid (omtrent 2 timer) tillater estimering av areal under kurven (AUC) og andre enkle målbare farmakokinetiske parametre, i tillegg er MDZ ikke et substrat for P-gp. Derfor er MDZ også en foretrukket *in vitro* probe [49, 50]. Det finnes flere metoder til fenotyping av CYP3A, men det viser seg at MDZ plasma-clearance er den mest pålitelige av de tilgjengelige metodene, og denne er derfor mye brukt for å studere CYP3A-aktivitet [51].



Figur 7. Kjemisk struktur og metabolismevei til MDZ. MDZ blir metabolisert til hovedmetabolitten 1'-OH-MDZ og til den sekundære-metabolitten 4-OH-MDZ.

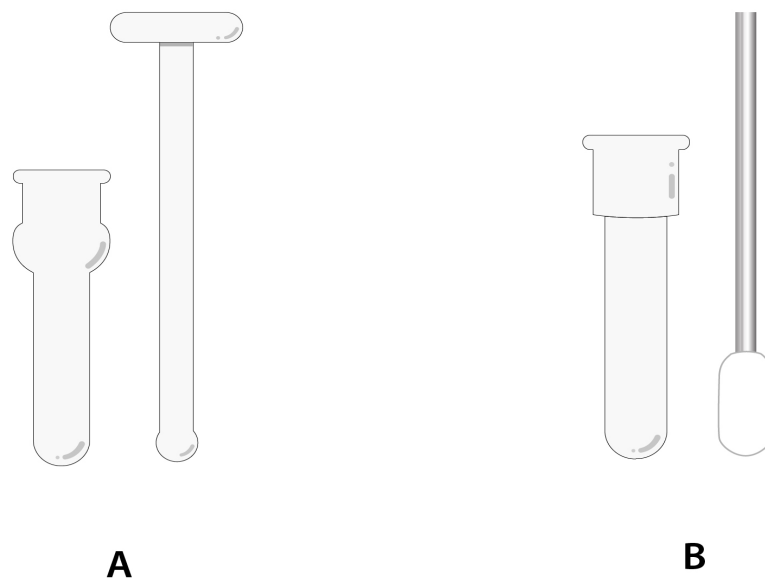
1.9 Cellefraksjonering

Cellefraksjonering er en mye brukt metode for å undersøke cellers bestanddeler. Cellefraksjonering består av homogenisering, som vil ødelegge vev og frigjøre cellulære komponenter til homogenatet, og sentrifugering, som vil separere individuelle komponenter i selve homogenatet i henhold til tetthet, størrelse og form [52].

1.9.1 Homogenisering

For de fleste vev og celsuspensjoner er væskehomonisering en mye brukt metode. Dounce-homogenisator har en pistill som er laget av glass hvor enden av pistillen er formet som en glasskule (Figur 8A). Den opereres manuelt ved å bruke håndkraft. Potter-Elvehjem-homogenisator har en pistill hvor enden består av teflon festet til motordrevne roterende metallskaft, som gjør at rotasjonshastigheten kan monitoreres (Figur 8B). Begge metodene

homogeniserer ved rotasjon og bevegelse av pistill, slik at vevet eller cellesuspensjonen blir tvunget gjennom det smale rommet mellom pistillen og glassrøret. For at metodene skal være effektive og reproducerbare, er det viktig å ha kontroll på: antall slag med pistillen, slagkraften, rotasjonshastigheten på pistillen og størrelsen og mengden på materialet som blir behandlet [52, 53]. Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisator gir en homogenisering som er mer skånsom og kontrollert i forhold til Precellys[®]24. Precellys er en nyere homogeniseringsmetode hvor det er små glasskuler i et rør som homogeniserer biologisk materiale på kort tid med stor hastighet [54].



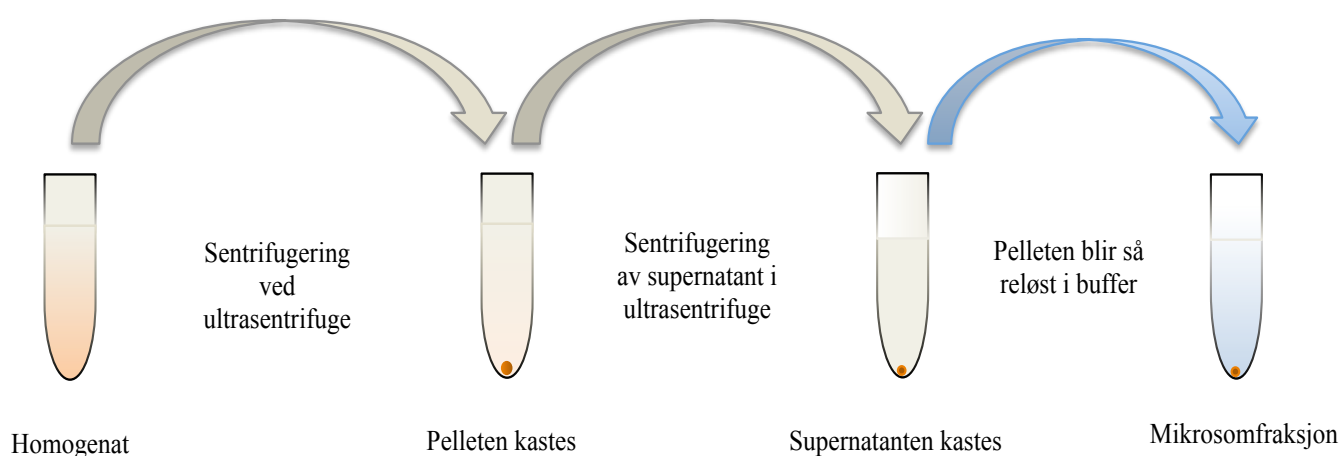
Figur 8. En illustrasjon av Dounce-homogenisator (A) og Potter-Elvehjem-homogenisator (B) som har blitt brukt til å homogenisere biopsiene.

1.9.2 Fraksjonering

Separasjon av ulike organeller i homogenat oppnås ved bruk av differensialsentrifugering. Dette involverer sentrifugering av homogenatet ved ulik hastighet slik at man får fraksjoner inneholdende ulikt materiale avhengig av sedimentasjonshastigheten til partiklene. Innholdet i fraksjonene er avhengig av sentrifugehastigheten og tiden. Sedimentasjonshastigheten til en partikkel kan bli definert ved denne ligningen (ligning 8):

$$s = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m)g}{9\eta}$$

hvor r_p er radiusen til partikkelen, ρ_p er tettheten, ρ_m er tettheten til mediet, g er sentrifugal-kraften og η er viskositeten til væsken. De viktigste faktorene som fører til forskjellige pelleter, er størrelsen og tettheten til partiklene i suspensjonen. Forskjell i tetthet og størrelse gjør at man kan skille for eksempel fragmenter fra plasmamembranen fra mitokondrier. De tyngste og største partiklene vil først sedimentere, supernatanten blir så sentrifugert igjen ved hurtigere hastighet over en periode, og dermed vil de mindre partiklene sedimentere (Figur 9). Dette kan justeres med ulik hastighet og sentrifugeringstid. Fordelen med differensial-sentrifugering er at det går raskt og at metoden er enkel å bruke [53].



Figur 9. Viser trinnvis fraksjonering av celleduspensjon (homogenatet) til en mikrosomfraksjon.

1.10 LC-MS

Separasjon

LC-MS (Væskeskromatografi-massespektrometri) er en metode som brukes for å kunne detektere legemidler i ulike preparater og i biologisk materiale. Omvendt-fase kromatografi er det mest brukte prinsippet for å separere stoffene ved hydrofob interaksjon, og en slik metode har blitt benyttet i denne oppgaven. De viktigste retensjonskreftene kalles «van der Waals-krefter». Metoden baserer seg på at prøvene blir injisert i strømmen av mobilfasen og blir presset gjennom en kolonne hvor de blir separert avhengig av stasjonærfasen. Stasjonærfasen velges ut i fra hvilke kjemiske egenskaper og struktur stoffene som skal analyseres har. Avhengig av stoffene vil de bli retardert etter hvor hydrofobe de er, det minst hydrofobe stoffet vil få minst retensjon og dermed minst retensjonstid [55].

Ionekilde

For at stoffene skal bli detektert må disse befinne seg som ioner i gassform. Stoffene må derfor omdannes fra væskefase til gassfase og denne konverteringen gjøres ved elektronspray-ionisering (ESI), som er den mest brukte metoden [56].

Deteksjon

Massespektrometri blir brukt for å kvantitativt analysere og detektere stoffene. Prøvene føres inn i instrumentet hvor de blir ionisert enten til positive ioner eller negative ioner. I masseanalysatoren separeres ionene etter deres masse-til-ladningsforhold (m/z). Detektoren registrerer mengden av ioner som dannes og hvilken masse disse har [55].

1.11 Hensikten med oppgaven

Basert på tidligere funn i vår forskningsgruppe at proteinuttrykk av CYP3A4 i tarm og lever i sykelige overvektige pasienter viser en invers sammenheng med BMI, var det ønskelig å studere CYP3A4-aktivitet i biopsier fra pasienter med BMI fra normal området helt opp i øvre sjikt av sykkelig overvekt. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle en metode for preparering av mikrosomer ved homogenisering og subcellulær fraksjonering av tarmbiopsier, som er mulig å få tatt av pasienter i kliniske studier. CYP3A4-aktiviteten skulle deretter bestemmes *ex vivo* i disse individuelle humane intestinale mikrosomene (HIM) ved bruk av MDZ som probe.

2 MATERIALER OG METODE

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikaler, mikrosomer og biopsi

Kjemikalier	Leverandør
1'-hydroksy-midazolam	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4'-hydroksy-midazolam	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetonitril for liquid chromatography (ACN)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniakk (NH ₃)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Bio-Rad Protein Assay fargeløsning	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Diazepam (DIA)	Diakonhjemmet sykehus, Oslo, Norge
EDTA (Etylendiamintetraeddiksyre)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Fettfri tørrmelk	Normilk AS, Oslo, Norge (gave)
Glyserol 100 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hepes	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
H ₂ SO ₄ (Svovelsyre)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre (HCOOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol for liquid chromatography (MeOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Midazolam (MDZ)	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Sveits
N ₂ -gass (Nitrogengass)	AGA Progas A/S, Oslo, Norge
NADPH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS (Natrium dodekyl sulfat)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sukrose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Trismabase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Biopsier	Leverandør
Leverhomogenat fra 6 pasienter	NCT00331565 (Biopsier fra en klinisk studie
Biopsier fra jejunum fra en pasient	i sykkelig overvektige pasienter, Sentralsykehuset i Vestfold, Tønsberg)

2.1.2 Utstyr

Utstyr	Produsent
Autoinjektor SIL-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Bovint serumalbumin	Pierce, Oud-Beijerland, Nederland
ChemiDoc™ MP imager, Image Lab™ software	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Chromacol seals and vails 1-CWV	Chromacol, Herts, United Kingdom
Corning® Centrifuge tubs (15 ml og 50 ml)	Corning Incorporated, MA, USA
Cryotube 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Denmark
Datasystem programvare, Class VP Chromatography, versjon 4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor massespektrometer LCMS-2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Dounce homogenisator: kontes glass duall®	VWR international, Leuven, Belgia
Eppendorfør 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Finnpipetter®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Finntip®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Forkolonne Inertsil C8-3, 5 µM, 3,0x10 mm	GL Sciences Inc, Tokyo, Japan
Heraeus Megafuge 16R Sentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Germany
Hybond-ECL membran	GE Healthcare, Germany
Immune-Star™ WesternC™ kit	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Kolonne Inertsil C8-3, 5 µM, 3,0x50 mm	GL Sciences Inc, Tokyo, Japan
Mikrobrønn plate	Thermo Fisher Scientific, Danmark
Milli-Q® Integral 3	Millipore A/S, Norge
Mini-Protean® TGX™ Gels	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Optima™ MAX Ultracentrifuge 130000 rpm	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
pH-meter Beckman 50 pH meter	Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA
Pumper LC-10AP VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Potter-Elvehjem homogenisator: kontes glass	IKA Eurostar 20, Wilmington, USA
Sekundær antistoff (geit anti-kanin mab) (LS1706515)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Skalpell steril	Swann-Morton Limited, Sheffield, England
Ultralydbad Sonorex™ RK100	Bandelin, Berlin, Tyskland

Stripette (5 ml og 10 ml)	Corning Incorporated, NY, USA
Switch FCV-12AH	Shimadzu, Kyoto, Japan
Systemkontroller SCL-10A VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Test tube soda glass 10x14x 0,8-1,0 mm	VWR international, Germany
The Belly Dancer™	Stovall life Science Inc, USA
Vannbad Julabo Sw22	Julabo gmbH, Seelbach, Germany
Vekt AB54	Mettler-Toledo, Inc., Columbus, OH, USA
Victor™ X4	Perkin Elmer, Finland
Whirlmikser MS 3 basic	IKA Works Inc, Wilmington NC, USA

2.1.3 Løsninger

Tabell 1. Løsning til homogenisering:

Sukrose/trisbuffer, pH = 7,4

0,32 M Sucrose	24,7 g
10 mM Trismabase	0,30 g
1,0 mM EDTA	0,093 g
Dest. Vann	ad 250 ml

Tabell 2. Løsning til mikrosomene:

Lise-Madsen buffer, pH = 7,4

0,25 M Sucrose	4,27 g
10 mM Hepes	0,12 g
2 mM EDTA	0,04 g
Dest. Vann	ad 50 ml

Tabell 3. Løsning til reløsing av analytt og inkubering:

Bufferløsning, pH = 7,4

200 mM Tris-H ₂ SO ₄	130 µl/rør
20 mM MgSO ₄	5,5 µl/rør
10 mM NADPH	35 µl/rør

Tabell 4A. Løsninger til LC-MS:**Mobilfase A:****0,05 ammoniumformiat-buffer pH = 4,4**

NH ₃ 25 %	4,036 ml
Kons. HCOOH	2,125 ml
Ionebyttet vann	1 l

Tabell 4B.**Mobilfase B:****Acetonitril 95 %: Metanol 5 %**

ACN	950 ml
MeOH	50 ml

Tabell 5A. Løsninger til western blott:**2X Sample Buffer:**

0,5 Tris HCL pH 6,8	6,25 ml
SDS 10 %	5 ml
Glyserol 100 %	7,5 ml
Dest. Vann	Ad 50 ml

Tabell 5B.**1X Sample Buffer:**

0,5 M Tris HCL pH 6,8	3,125 ml
SDS 10 %	2,5 ml
Glyserol 100 %	3,75 ml
Dest. Vann	Ad 50 ml

Tabell 5C.**Blotto (5 % tørrmelk i T-TBS løsning):**

Tørrmelk	5 g
T-TBS løsning	Ad 100 ml

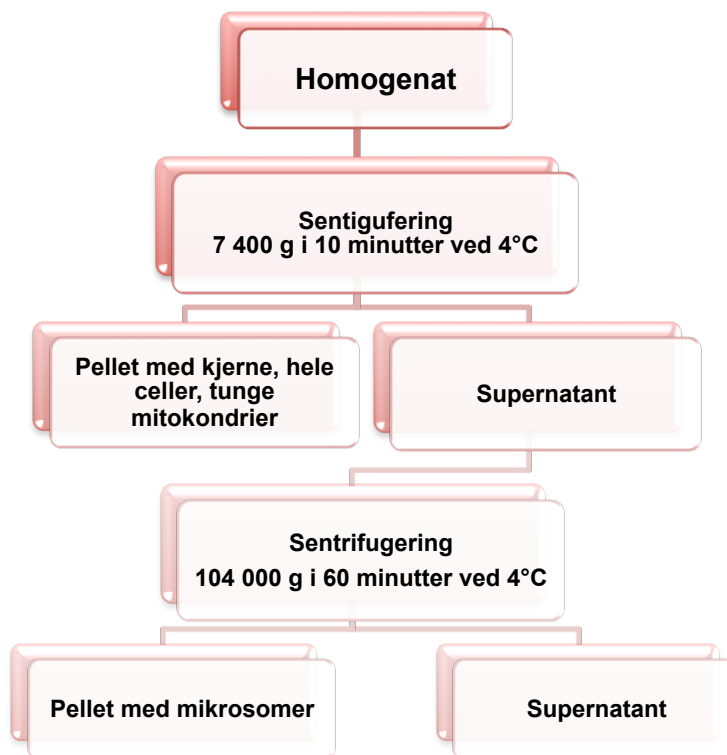
2.2 Metode

2.2.1 Homogenisering og fraksjonering

Utførelse

Biopsier fra jejunum fra en pasient som gjennomgikk bariatrisk kirurgi (NCT00331565) ble homogenisert med Potter-Elvehjem- eller Dounce-homogenisator. Disse metodene ble benyttet basert på tidligere arbeid i vår forskningsgruppe [57, 58]. Biopsibitene ble først delt i mindre biter ved bruk av en steril skalpell på en glassplate som var dekket av aluminiumsfolie. Alt ble holdt på is. Deretter ble vevsbitene veid og videre homogenisert. Ved homogenisering ved Dounce-homogenisator ble en biopsibit overført til Dounce-glassrøret, og tilsatt 0,32 M sukrosebuffer (Tabell 1) som ble standardisert ut ifra vekten til biopsien (5-10 % homogenat). Biopsibiten ble kontet 20 ganger med glasspistill. Deretter ble homogenatet overført til sentrifugerør, og en liten del av homogenatet ble fryst ned. Homogenatet ble sentrifugert ved 7 400 g (12 000 rpm) i 10 minutter ved 4 °C (Optima™ MAX Ultracentrifuge), og supernatanten ble videre sentrifugert ved 104 000 g (45 000 rpm) i 60 minutter ved 4°C (Optima™ MAX Ultracentrifuge) (Figur 10). Den endelige pelleten, inneholdende mikrosomer, ble reløst i 0,25 M Lise-Madsen buffer (Tabell 2) og fryst ned ved -70°C inntil videre testing.

Ved Potter-Elvehjem-homogenisering ble en biopsibit overført til et Potter-Elvehjem-glassrør, og tilsatt 0,32 M sukrosebuffer (Tabell 1) som ble standardisert ut ifra vekten til biopsien (5-10 % homogenat). Løsningen med biopsibiten ble kontet 10 ganger med teflonpistill. Hastigheten på teflonpistillen var 400 rpm. Deretter ble homogenatet sentrifugert på samme måte som Dounce-homogenatet og deretter reløst før det ble fryst ned ved -70°C inntil videre testing.



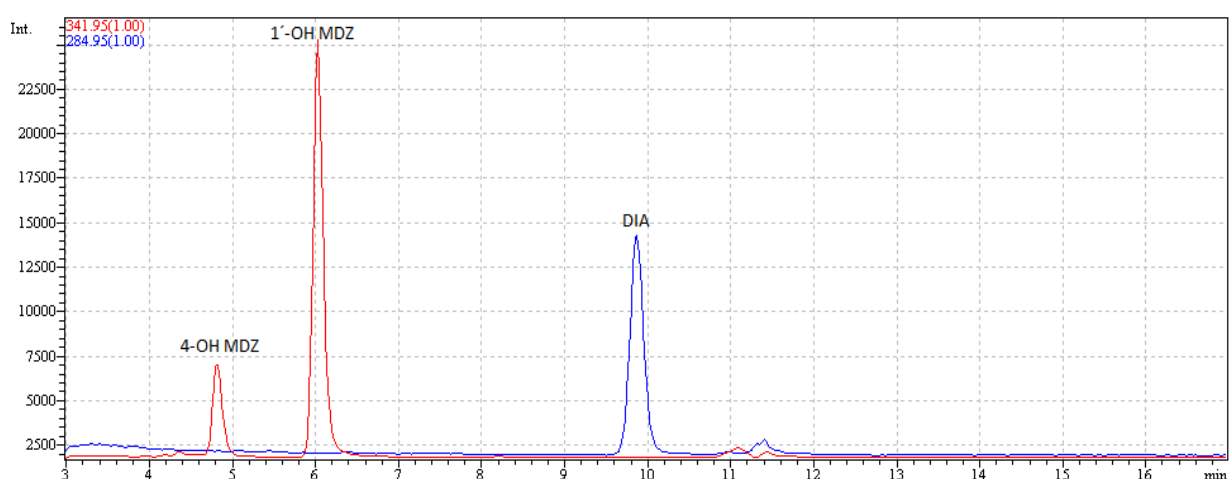
Figur 10. En illustrasjon av den trinnvise fraksjoneringen av homogenatet til pellet inneholdende mikrosomer.

2.2.2 Metabolisme av MDZ som funksjon av substratkonsentrasjon

Innledende metabolismeforsøk ble gjort med 6 leverhomogenater, som var tidligere homogenisert med Precellys-homogenisator [59]. Videre forsøk ble utført i mikrosomfraksjoner og homogenater dannet ved Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisator fra enda en pasient fra samme studie. Mikrosomløsningen ble fortynnet 1:2 før tilsetning, mens homogenatløsningen ble tilsatt ufortynnet til bufferløsning (Tabell 3) i inkubasjonsrør. Konsentrasjonene til de ulike stoffene i bufferløsningen og inkubasjonsbetingelsene er tidligere beskrevet [58]. Mikrosomene og homogenatene (50 µl/rør) ble først preinkubert i 118 mM Tris- H₂SO₄ (pH 7,4), 0,5 mM MgSO₄ og 1,6 mM NADPH i 5-10 minutter, blandingen ble satt på vannbad ved 37°C og ved resting (trinn SA 1). Stamløsning av MDZ løst i metanol ble tilsatt i et glassrør og metanolen ble dampet av med N₂-gass, deretter ble den reløst i bufferløsning (Tabell 3). Reløst MDZ ble så tilsatt i ulike konsentrasjoner fra 0,5 til 20 µM til hvert rør, som inneholdt bufferløsning og mikrosomer, med et halvt minutt forskyvning. Total inkubasjonstid var 7,5 minutt og totalt inkubasjonsvolum var 220 µl [60]. Etter 7,5 minutter ble metabolismen terminert ved tilsetning av iskald acetonitril (ACN) tilsatt internstandard, diazepam (0,044 µM) og mikset på whirlmikser i minst 10 sekunder. Rørene ble satt på is i minimum 30 minutter og deretter sentrifugert ved 1 600 g (3500 rpm), 4°C, i 5 minutter. Supernatanten ble overført til LC-MS vials og deretter fryst ned ved -20°C inntil videre analysing ved LC-MS.

2.2.3 LC-MS

Metabolittene til MDZ, 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ, ble analysert ved en tidligere validert LC-MS metode [60]. I denne metoden ble prinsippet for omvendt-fase kromatografi brukt. Analyttene ble separert ved en C₈ (Inertsil C₈ 3.0 x 50 mm, 5 µM, GL.Sciences Inc., Japan) analyse kolonne som ble beskyttet med en C₈ forkolonne (Inertsil C₈, 3.0 x 10 mm, 5 µM, GL.Sciences Inc., Japan) ved hjelp av gradienteluering med to ulike mobilfaser, mobilfase A (Tabell 4A) og mobilfase B (Tabell 4B). Både mobilfase A og B ble levert til kolonnen hvor bidraget av mobilfase B steg fra 25 % til 37,5 % i løpet av 5 minutter. Sammensetningen av de to mobilfasene forholdt seg slik konstant i 2,5 minutter. I løpet av de neste 2,5 minuttene steg mobilfase B til 46,7 % og deretter raskt til 80 % etter 10 minutter. Fra 11-17 minutter ble kolonnen reekvilibrert ved at mobilfase B ble reversert til 25 % som var utgangskonsentrasjonen. Hastigheten på mobilfasen var 0,5 ml/min i analysen og 1 ml/min ved reekvilibreringen av kolonnen. Etter 3 minutter ble mobilfase A ledet utenfor detektoren for å unngå kontaminasjon i MS-systemet. De opparbeidet prøvene med metabolismeforsøk ble injisert med 10 µl volum og analyse tiden var totalt 17 minutter. Diazepam (DIA) ble brukt som internstandard med en konsentrasjon på 0,044 µM. Metabolitten 1'-OH-MDZ hadde en retensjonstid på 4,7 minutter, metabolitten 4-OH-MDZ hadde en retensjonstid på 6 minutter og internstandarden hadde en retensjonstid på 9,7 minutter (Figur 11). Det ble kjørt en standardkurve med 6 ulike konsentrasjoner av 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ, med 2 paralleller i LC-MS. Konsentrasjonene var fra 0,013-0,15 µM og ble tilsatt 150 µl ACN og internstandard DIA.



Figur 11. Et kromatogram av 4-OH-MDZ, 1'-OH-MDZ og internstandarden diazepam (DIA 0,044 µM) med en av standardkonsentrasjonene (0,013 µM) brukt i standardkurven.

2.2.4 Proteinmåling

Totalprotein ble målt i mikrosomfraksjoner og homogenater med utgangspunktet i Bradford metoden [61]. Alle mikrosomfraksjonsprøvene ble fortynnet 1:20 med Lise-Madsen buffer (Tabell 2), mens homogenatene ble fortynnet 1:100 med samme buffer. Standardrekken, bestående av bovint serumalbumin (BSA) og Lise-Madsen buffer (Tabell 2) med kjente konsentrasjoner (0-300 µg/ml), og prøvene ble fordelt på mikroplatebrønner med et volum på 10 µl med 2 paralleller. Sterilfiltrert Bio-Rad Protein Assay fargeløsning (10 ml Bio-Rad med Coumassi Brilliant Ble G-250 og 40 ml destillert vann) ble tilsatt til alle mikroplatebrønnene med et volum på 200 µl. Platen ble inkubert i minimum 5 minutter for å oppnå kompleksdannelse mellom fargeløsningen og proteinene. Denne kompleksdannelsen førte til en endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Mengden protein ved 595 nm ble detektert av et spektrofotometer (VICTOR™ X4, Perkin Elmer). De ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene ble estimert ved hjelp av standardkurven med kjente konsentrasjoner av BSA.

2.2.5 Western blott analyse

Prinsipp

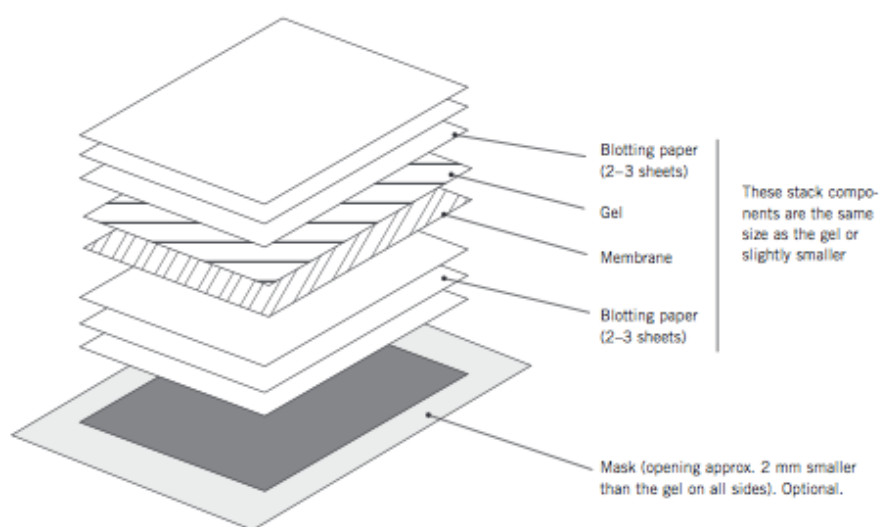
Western blotting, også kalt immunoblotting, er en analyse teknikk som blir brukt til å identifisere og bestemme størrelsen på spesifikke proteiner i en vevsprøve eller ekstrakt, som for eksempel homogenat. Ved hjelp av gelelektroforese blir de denaturerte proteinene separert etter størrelse. Proteinbåndene blir så overført fra gelen til en membran med et elektroforesekkammer, denne prosessen kalles elektroblotting. Deretter blir uspesifikke bindinger blokkert med blokkingsbuffer (blotto), slik at man hindrer interaksjoner mellom membranen og antistoffet. Etter blokking kan proteinene bli detektert ved å inkubere membranen med et primær antistoff. Etter dette blir membranen vasket før den blir inkubert med sekundær antistoff også vasket igjen. Proteinene blir deretter fremkalt med Gel dok [62, 63].

Utførelse

Prøvene ble fortynnet i ulike konsentrasjoner (1:10, 1:20, 1:50 eller 1:100) med PBS og 2 x samplebuffer (Tabell 5A) og videre fortynnet med 1 x samplebufferen (Tabell 5B) til forholdet 1:50, fortynningen ble bestemt ut ifra resultatene fra western analysen. En standardrekke av CYP3A4 ble applisert til brønnene for å kunne bestemme innholdet av

CYP3A4 i mikrosomfraksjon- og homogenat-løsningene. CYP3A4-insektmikrosomene hadde fortynninger på 1:1000, 1:2000 og 1:4000. De ferdig støpte gelene ble satt i gelkar og prøvene ble så applisert i brønnene (10 μ l). I tillegg til prøvene ble det også applisert en proteinstandard, som inneholdt ulike proteiner med kjente molekylstørrelser, og en ferdig laget standardrekke (15 μ l). Elektroforesebuffer ble tilsatt i karet. Elektroforesen brukte 45 minutter med en elektrisk spenning på 200 Volt.

Til blottingen over på membranen ble filterpapir og membran fuktet i 5-10 minutter med blottebuffer før sandwichen ble laget (Figur 12). Strømstyrken ble stilt inn til 64 mA i 60 minutter. Deretter ble membranen blokket med Blotto (Tabell 5C) i 60 minutter ved romtemperatur og vipping på The Belly Dancer (Stovall life Science Inc, USA). Blokker-løsningen ble helt av og primær antistoff (CYP3A4 1:5000), som var løst i blotto, ble tilsatt membranen og inkubert over natten på kjølerom med vipping.



Figur 12. Lagvis sandwich, hvor man først legger på tre lag med blottepapir, deretter legges membranen og gelen på også avsluttes det med 3 lag med blottepapir.

Etter inkubering ble membranen vasket med T-TBS 4 ganger i 10 minutter ved romtemperatur og vipping. Sekundærantistoff ble tilsatt i blotto i fortynningen 1:5 i T-TBS. Deretter ble 15 ml av sekundærantistoff-løsningen tilsatt til hver membran. Dette ble så inkubert i 60 minutter ved romtemperatur og vipping. Membranen ble så skylt 2 ganger med

T-TBS før vaskingen med T-TBS 4 ganger i 10 minutter ble gjentatt. Fremkallingen av membranen ble gjort med substratet Bio-Rad immunstar western-C. Med 3,5 ml av hver løsning ble membranene inkubert i 5 minutter. Deretter ble membranen fremkalt i ChemiDoc™ MP imager, Image Lab™ software.

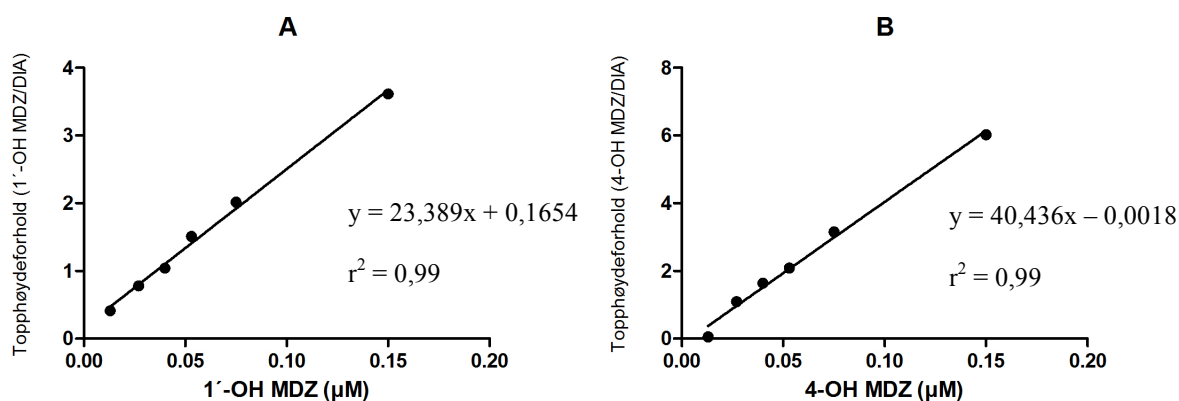
2.3 Databearbeidelse

Kromatogrammene ble registrert i dataprogrammet LCMS-solution (Versjon 2.04, Shimadzu corporation, Japan) og der ble også topp-høydene og retensjonstidene beregnet for 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ. Topphøydene ble overført til Microsoft Excel for Mac 2011 (Microsoft corporation, USA) hvor topphøydeforholdet analytt/internstandard ble beregnet videre. Ut ifra dette ble det bestemt at bare 1'-OH-MDZ skulle brukes videre i oppgaven siden den sekundære metabolitten 4-OH-MDZ ble dannet i liten grad ved de laveste MDZ konsentrasjonene. Excel ble også benyttet for å beregne de ulike korrigeringene for protein og CYP3A4-innhold i løsningene. Ikke-lineær regresjon og lineær regresjon av analysedataene ble utført ved hjelp av GraphPad Prism versjon 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Den beste tilpasningen til Michaelis-Menten kinetikk eller de ulike atypiske kinetikk modellene ble undersøkt for hvert forsøk. SPSS® (versjon 22, IBM corp®, Armonk, NY) ble benyttet til statistiske analyser (to utvalgs t-test) av de kinetiske parameterne. Statistisk signifikans ble vist med P-verdier <0,05.

3 RESULTATER

3.1 Kvantifisering av MDZ-metabolitter ved LC-MS

Standardkurver, analysert ved LC-MS, viste en linearitet av henholdsvis 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ og topphøydeforholdet mellom metabolitt og internstandard. Lineær regresjon av analysedataene ga best tilpasning. Korrelasjonskoeffisienten (r^2) varierte fra 0,95-0,99 for begge metabolittene. Eksempel på standardkurver er vist i figur 13. Data for 4-OH-MDZ er ikke presentert i oppgaven, siden denne sekundære metabolitten ble dannet i liten grad ved de laveste MDZ konsentrasjonene.

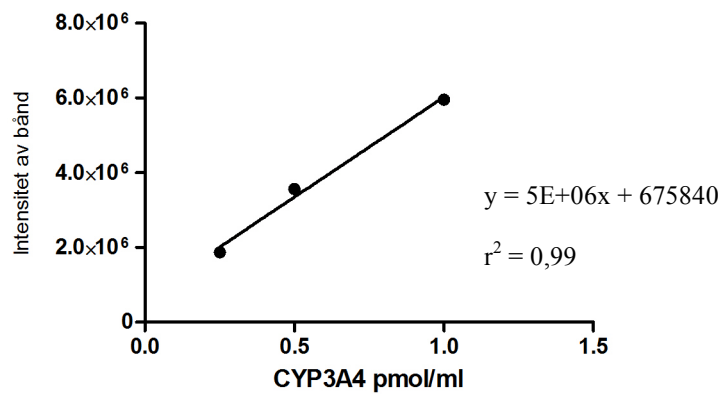


Figur 13. Eksempel på standardkurver for metabolittene 1'-OH-MDZ (A) og 4-OH-MDZ (B). Hvert punkt er gjennomsnitt av to paralleller.

3.2 Kvantifisering av CYP3A4-uttrykk

Western blott analyse av insektmikrosomer, som uttrykker CYP3A4, viste en lineær sammenheng mellom mengden av CYP3A4 og intensiteten av båndene på gelen ($r^2 = 0,99$) i området 0,25-1 pmol/ml (Figur 14). Standardkurvene ble anvendt til å bestemme CYP3A4-innholdet i homogenater og mikrosomfraksjoner i de ulike forsøkene. Lineær regresjon av analysedataene ga best tilpasning. Uttrykket av CYP3A4 ble korrigert for

totalprotein i løsnningene. I homogenatene varierte proteinmengden av CYP3A4 fra 6-139 pmol CYP3A4/mg protein, mens for mikrosomfraksjonene varierte mengdene fra 11-99 pmol CYP3A4/mg protein.



Figur 14. Eksempel på en standardkurve for CYP3A4 ved bruk av western blott analyse. Lineær regresjon ga korrelasjonsverdi på 0,99.

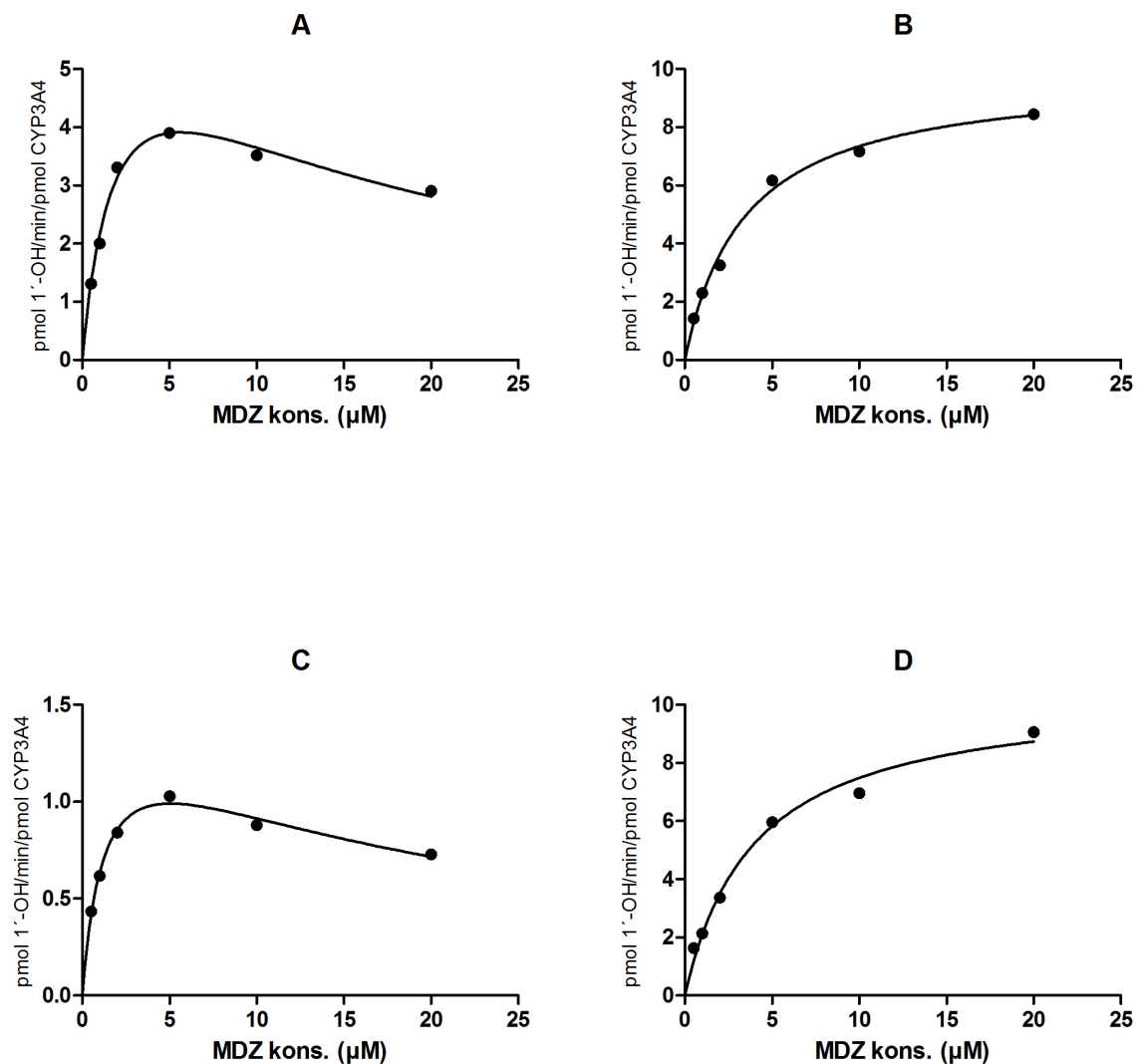
3.3 Metabolismestudier med MDZ

3.3.1 Store biopsier

Tidlig testing av leverhomogenater laget med Precellys viste ingen CYP3A4-aktivitet. Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisatorer er to mer skånsomme metoder enn Precellys [52]. Selv om metoden er rask og enkel, er den lite egnet for studering av CYP3A4-aktivitet.

Dounce-mikrosomer

Det ble påvist CYP3A4-aktivitet i HIM dannet ved homogenisering med Dounce-homogenisator (omtalt som Dounce-mikrosomer). Biopsiene som ble homogenisert varierte fra 200-500 mg. Dannelse av 1'-OH-MDZ i mikrosomfraksjonene økte med økende konsentrasjon av MDZ. Dannelse av metabolitten i fire separate forsøk i Dounce-mikrosomer er vist i figur 15. Hastighetskurvene, som er tilpasset ikke-lineær regresjon, viser Michaelis-Menten lignende forløp (M.M), men i to av forsøkene ga ligningen som beskriver substrat-hemming (S.I) best tilpasning.



Figur 15. Hastighetskurver for dannelse av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for fire individuelle forsøk A-D i HIM isolert fra tarmbiopsier ved Dounce-homogenisator. Ikke-lineær regresjon ga best tilpasning og for to av forsøkene ga ligningen som beskriver substrathemming best tilpasning. Forsøk A-D er forsøk 1-4 (Tabell 6).

Estimerte enzymkinetiske parametre for dannelse av 1'-OH-MDZ er vist i tabell 6 for de fire individuelle forsøkene i Dounce-mikrosomer. For dannelse av 1'-OH-MDZ var de estimerte V_{\max} -verdiene 47-125 pmol 1'-OH-MDZ/min/mg protein, K_m -verdiene var 1,3-4,0 µM. Dette ga CL_{int} -verdier for dannelse av 1'-OH-MDZ på henholdsvis 31-39 µl/min/mg protein, ved korrigering for mengde totalprotein i løsningene. Ved korrigering for CYP3A4 ble verdiene for V_{\max} endret til 1,5-10,5 pmol 1'-OH-MDZ/min/pmol CYP3A4 og ga dermed CL_{int} -verdier på 1,1-3,3 µl/min/pmol CYP3A4. Verdiene viser liten variasjon i CL_{int} -verdiene ved korrigering for totalprotein (variasjonskoeffisienten (CV) = 8,6 %), mens ved korrigering for CYP3A4 var variasjons-koeffisienten noe høyere (CV = 36 %).

Tabell 6. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelsen av 1'-OH-MDZ i HIM ved bruk av Dounce-homogenisator i fire individuelle forsøk (snitt \pm standardavvik (SD)).

Forsøk	K_m (μM)	V_{max}^1 (pmol/min/ mg protein)	V_{max}^2 (pmol/min /pmol)	CL_{int}^1 ($\mu l/min/mg$ protein)	CL_{int}^2 ($\mu l/min/pmol$)	Tilpasning	r^2
1	2,1	82	6,8	39	3,3	S.I	0,98
2	3,5	121	9,9	35	2,9	M.M	0,99
3	1,3	47	1,5	35	1,1	S.I	0,98
4	4,0	125	10,5	31	2,6	M.M	0,99
Snitt \pm SD	$2,7 \pm 1,2$	94 ± 37	7 ± 4	35 ± 3	$2,5 \pm 0,9$		
CV (%)	44 %	39 %	57 %	8,6 %	36 %		

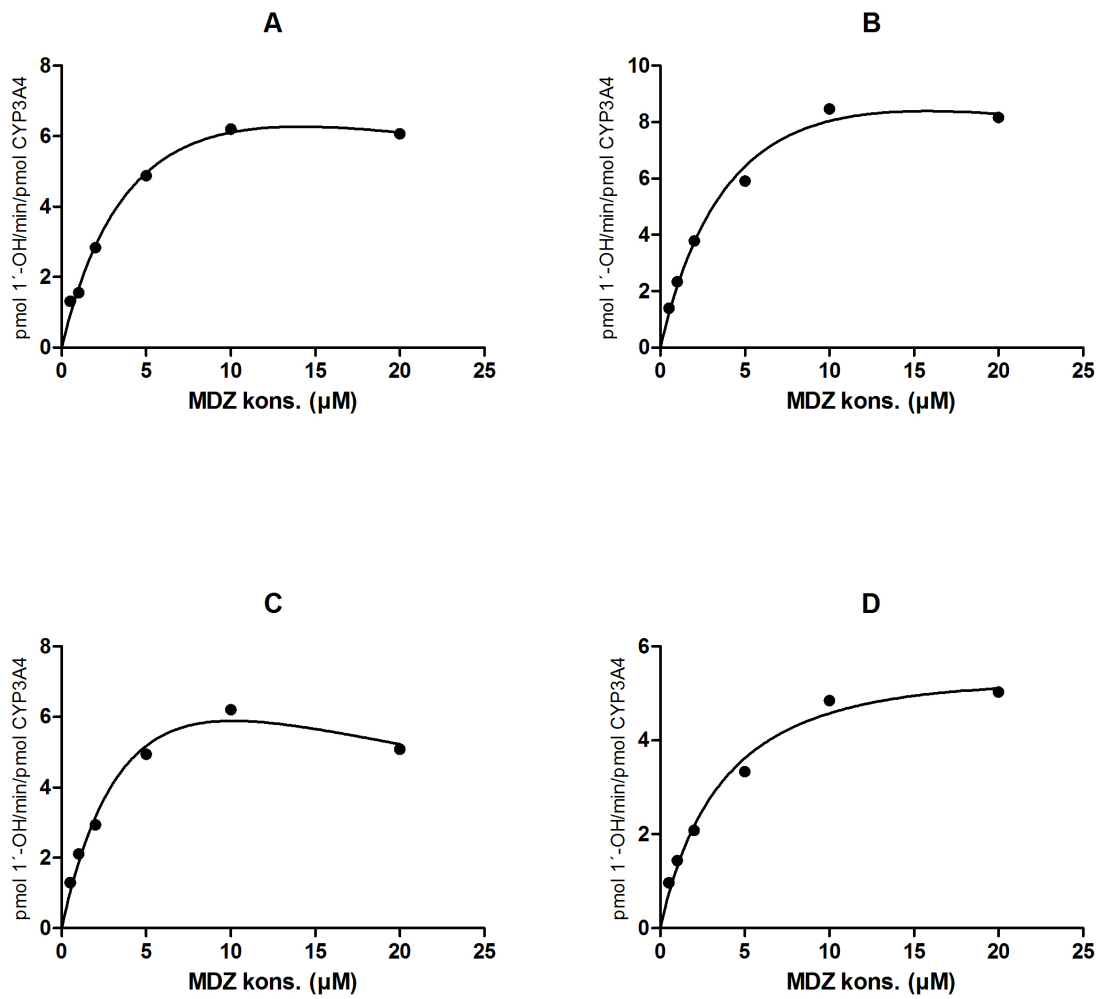
1: per mg protein

2: per pmol CYP3A4

Potter-Elvehjem-mikrosomer

Figur 16 viser fire separate CYP3A4-aktivitetsforsøk i HIM dannet ved bruk av Potter-Elvehjem som homogeniseringsmetode. Dannelsen av 1'-OH-MDZ økte med økende konsentrasjon av MDZ. Hastighetskurvene viste også her Michaelis-Menten lignende forløp, men den beste tilpasningen var med ligningen som beskriver substrathemming.

Estimerte enzymkinetiske parametre for dannelsen av 1'-OH-MDZ er vist i tabell 7 for de individuelle forsøkene med mikrosomfraksjoner dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator. Estimering av K_m ga verdier på 4,2-5,7 μM . V_{max} -verdiene var 73-216 pmol 1'-OH-MDZ/min/mg protein som ga en CL_{int} -verdi på henholdsvis 17-38 $\mu l/min/mg$ protein. Ved korrigering for mengde CYP3A4 ble V_{max} -verdiene endret til 7-14 pmol 1'-OH-MDZ/min/pmol CYP3A4 som igjen ga CL_{int} -verdier på 1,6-2,6 $\mu l/min/pmol$ CYP3A4. Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetode ga lavest variabilitet i CL_{int} ved korrigering for CYP3A4 (CV = 19 %), mens ved totalprotein korrigering var variasjonskoeffisienten noe høyere (CV = 30 %).



Figur 16. Hastighetskurver for dannelse av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for fire individuelle forsøk A-D i HIM isolert fra tarmbiopsier ved Potter-Elvehjem-homogenisator. Ikke-lineær regresjon ved bruk av ligning som beskriver substrathemming ga best tilpasning. Forsøk A-D er forsøk 1-4 (Tabell 7)

Tabell 7. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelse av 1'-OH-MDZ i HIM dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator i fire individuelle forsøk (snitt \pm SD).

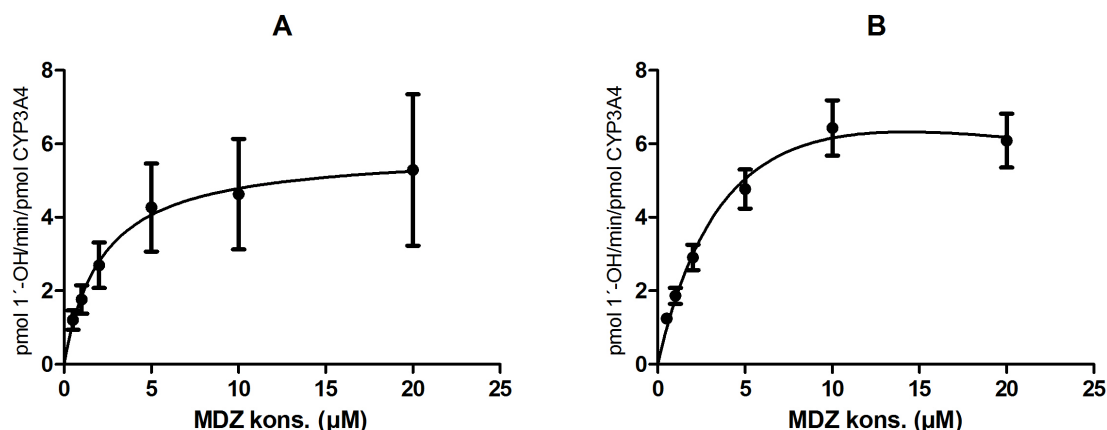
Forsøk	K_m (μ M)	V_{max}^1 (pmol/min/ mg protein)	V_{max}^2 (pmol/min /pmol)	CL_{int}^1 (μ l/min/mg protein)	CL_{int}^2 (μ l/min/pmol)	Tilpasning	r^2
1	5,7	173	11	30	2,0	S.I	0,99
2	5,6	216	14	38	2,6	S.I	0,99
3	5,7	188	13	33	2,2	S.I	0,98
4	4,2	73	7	17	1,6	S.I	0,98
Snitt \pm SD	5,3 \pm 0,8	163 \pm 63	11 \pm 3	30 \pm 9	2,1 \pm 0,4		
CV (%)	15 %	38 %	27 %	30 %	19 %		

1: per mg protein

2: per pmol CYP3A4

Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisering sammenlignet

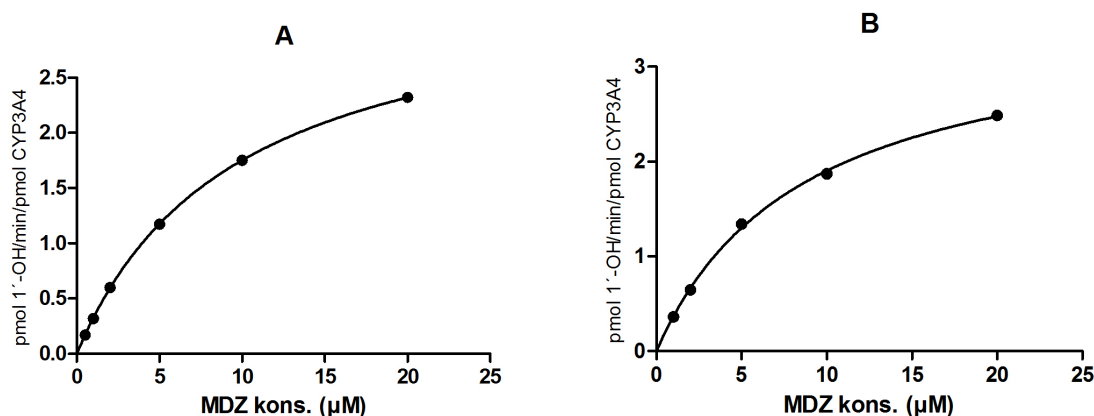
Det ble påvist CYP3A4-aktivitet i HIM ved bruk av både Potter-Elvehjem- og Dounce-homogenisator. Estimerte enzymkinetiske parametre for begge metodene er vist i tabell 6 og 7. Dounce- og Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetodene ga mikrosomfraksjoner med tilsvarende CL_{int} -verdier, både ved protein- og CYP-korrigerings. Dette tilsier at metodene ga mikrosomfraksjoner med lignende evne til å metabolisere MDZ. Den største forskjellen mellom de to metodene var K_m -verdiene. Mikrosomfraksjoner dannet ved Potter-Elvehjem-metoden ga signifikant ($P=0,016$) høyere K_m -verdi enn mikrosomfraksjoner dannet ved Dounce-metoden. For de andre parametrene var det ingen signifikant forskjell mellom metodene, men det var en tendens til høyere V_{max} -verdier ved Potter-Elvehjem-metoden, noe som førte til lignende CL_{int} -verdier (Tabell 6 og 7). Det var større interdag-variabilitet mellom forsøkene, for dannelse av 1'-OH-MDZ, i mikrosomfraksjonene dannet ved Dounce-metoden enn i mikrosomfraksjonene dannet ved Potter-Elvehjem-metoden (Figur 17). I tillegg var variasjonskoeffisienten for de ulike enzymkinetiske parametrene lavere for mikrosomfraksjonene dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator enn mikrosomfraksjonene dannet ved Dounce-homogenisator, med unntak av CL_{int} -verdien korrigert for protein (Tabell 6 og 7).



Figur 17. Gjennomsnittshastighetskurver for dannelse av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon. Kurveforløp A viser snittkurve (snitt \pm SD) av mikrosomfraksjoner dannet ved Dounce-homogenisator, mens kurveforløp B viser snittkurve (snitt \pm SD) av mikrosomfraksjoner dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator.

Dounce-homogenat

Studier av CYP3A4-aktivitet i homogenat fra biopsien som ble homogenisert med Dounce-homogenisator viste Michaelis-Menten lignende forløp ($r^2 = 0,99-1$). Hastighetskurver for dannelse av 1'-OH MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon er vist i figur 18.



Figur 18. Hastighetskurver for dannelse av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for to individuelle forsøk A og B i homogenat isolert fra tarmbiopsier ved Dounce-homogenisator. Ikke-lineær regresjon ved bruk av ligning som beskriver Michaelis-Menten kinetikk ga best tilpasning ($r^2 = 0,99-1$). Forsøk A og B er forsøk 1 og 2 (Tabell 8).

De estimerte K_m -verdiene ble lignende for begge forsøkene (Tabell 8). V_{max} -verdiene ble noe varierende med verdier på 478 og 42 pmol 1'-OH-MDZ/min/mg protein som også ga ulike CL_{int} -verdier på henholdsvis 50 og 5 μ l/min/mg protein ved korrigering av proteinmengden.

Ved korrigering for CYP3A4 ble V_{\max} -verdiene lignende for begge forsøkene. Dette gjaldt også for CL_{int} -verdiene når det korrigeres for CYP3A4.

Tabell 8. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelsen av 1'-OH-MDZ i intestinalt homogenat ved bruk av Dounce-homogenisator i 2 individuelle forsøk (snitt \pm SD).

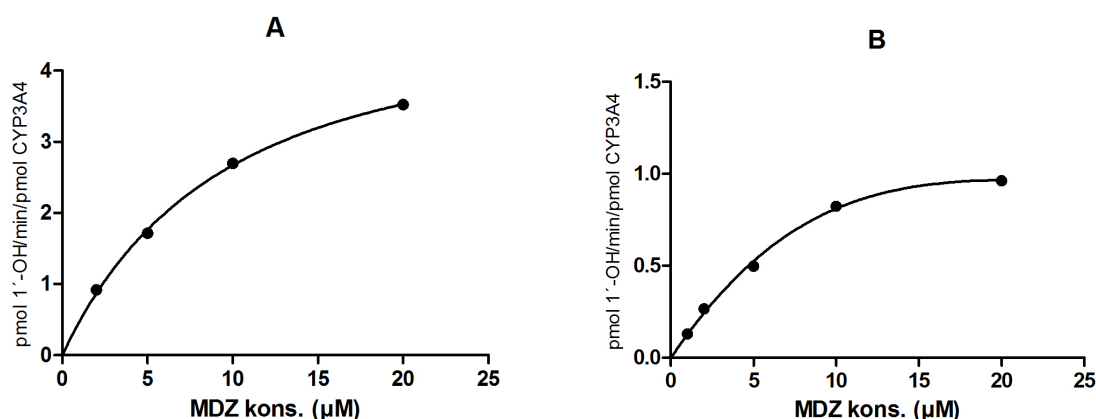
Forsøk	K_m (μM)	V_{\max}^1 (pmol/min/ mg protein)	V_{\max}^2 (pmol/min/ pmol)	CL_{int}^1 ($\mu\text{l/min/mg}$ protein)	CL_{int}^2 ($\mu\text{l/min/pmol}$)	Tilpasning	r^2
1	9,6	478	3,4	50	0,36	M.M	1
2	8,7	42	3,6	5	0,41	M.M	0,99
Snitt \pm SD	$9,1 \pm 0,7$	260 ± 308	$3,5 \pm 0,1$	27 ± 32	$0,38 \pm 0,04$		

1: per mg protein

2: per pmol CYP3A4

Potter-Elvehjem-homogenat

Hastighetskurver for dannelsen av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon i homogenater dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator viste Michaelis-Menten lignende forløp, hvor ligningen for substrat hemming ga best tilpasning til forsøk 1 (Figur 19).



Figur 19. Hastighetskurver for dannelsen av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for to individuelle forsøk A og B i homogenat isolert fra tarmbiopsier ved Potter-Elvehjem-homogenisator. Ikke-lineær regresjon ga best tilpasning, hvor bruk av ligning som beskriver substrathemming ga best tilpasning til forsøk 1 ($r^2 = 0,99$). Forsøk A og B er forsøk 1 og 2 (Tabell 9).

De estimerte K_m -verdiene ble noe ulike mellom de to forsøkene (Tabell 9). V_{\max} -verdiene var ulike med verdier på 271 og 79 pmol 1'-OH-MDZ/min/mg protein som igjen ga ulike CL_{int} -

verdier ved korrigering av proteinmengden. Ved korrigering for CYP3A4 ble de enzymkinetiske parametrene, V_{\max} og CL_{int} , mer lignende for de to forsøkene (Tabell 9).

Tabell 9. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelsen av 1'-OH-MDZ i intestinalt homogenat ved bruk av Potter-Elvehjem-homogenisator i 2 individuelle forsøk (snitt \pm SD).

Forsøk	K_m (μM)	V_{\max}^1 ($\text{pmol/min/mg protein}$)	V_{\max}^2 (pmol/min/pmol)	CL_{int}^1 ($\mu\text{l/min/mg protein}$)	CL_{int}^2 ($\mu\text{l/min/pmol}$)	Tilpasning	r^2
1	10	271	5,3	27	0,53	M.M	0,99
2	27	79	3,5	3	0,13	S.I	0,99
Snitt \pm SD	18 ± 12	175 ± 136	$4,6 \pm 1,6$	15 ± 17	$0,33 \pm 0,28$		

1: per mg protein

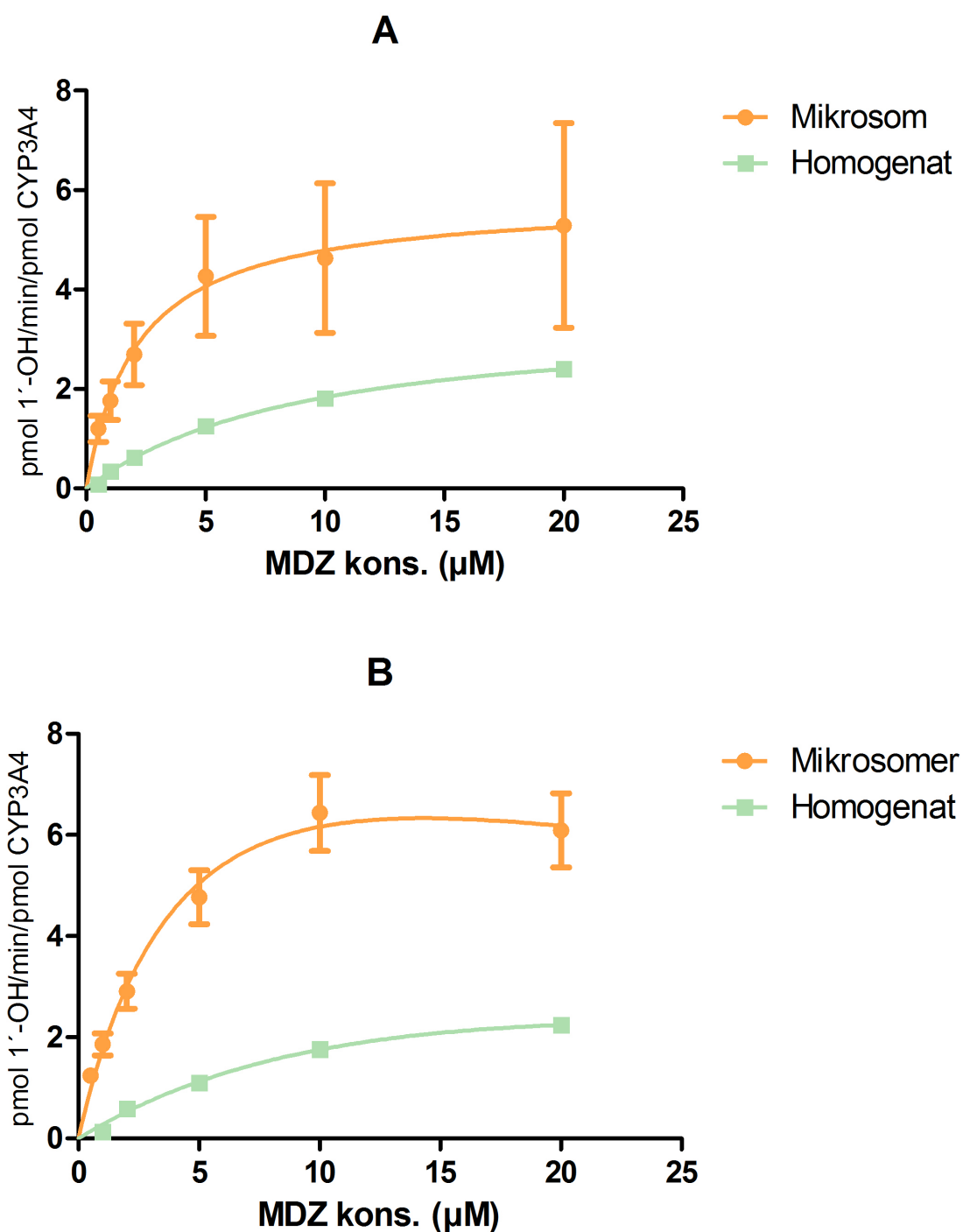
2: per pmol CYP3A4

Metabolismeforsøkene i homogenat dannet ved Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisator viste stor variasjon i V_{\max} ved korrigering for totalprotein (Tabell 8 og 9). Ved korrigering for CYP3A4 var det betydelig mindre variabilitet i parametrene. Den store variasjonen i V_{\max} kan skyldes at det kun ble gjort to forsøk for både Dounce- og Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetodene og at det var stor variasjon i totalprotein i de ulike homogenatene.

Homogenater og mikrosomfraksjoner sammenlignet

Metabolismeforsøk med homogenater og mikrosomfraksjoner ble sammenlignet (Figur 20). CYP3A4-aktiviteten i mikrosomfraksjonene laget ved Dounce-homogenisator var signifikant ($P = 0,022$) 6 ganger høyere enn i homogenatene, beregnet fra CL_{int} -verdiene korrigert for CYP3A4. Det samme gjaldt for mikrosomfraksjonene laget med Potter-Elvehjem-homogenisator, her var også aktiviteten til CYP3A4 signifikant ($P = 0,006$) 6 ganger høyere i mikrosomene enn i homogenatene beregnet fra CL_{int} -verdiene korrigert for CYP3A4. Det var større forskjell i metabolittdannelsen mellom mikrosomfraksjonene og homogenatene dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator enn mellom mikrosomfraksjonene og homogenatene dannet ved Dounce-homogenisator (Figur 20). Dette kan tyde på en større anrikning ved benyttelse av Potter-Elvehjem-homogenisator enn ved benyttelse av Dounce-homogenisator. Ved homogenisering til homogenat og videre subcellulær fraksjonering av mikrosomer får man en anrikning av CYP3A4 i mikrosomfraksjonen, og dette kan tyde på økt spesifikk

aktivitet i den fraksjonen i forhold til homogenatet. Dette gjaldt for både Dounce- og Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetodene.

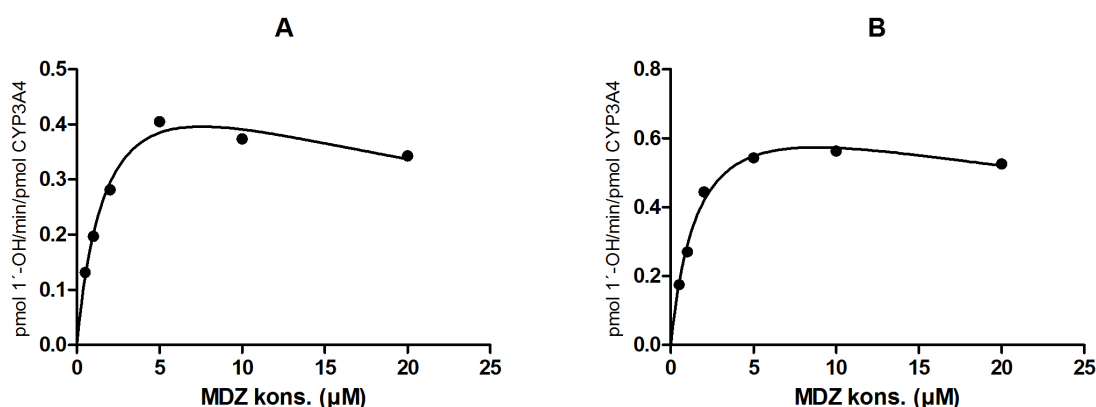


Figur 20. Sammenligning av hastighetskurver for dannelsen av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for homogenat og mikrosomfraksjoner dannet ved Dounce-homogenisator (A) og for homogenat og mikrosomfraksjoner dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator (B). Figurene viser at det er en anrikning av CYP3A4 i mikrosomfraksjonene i forhold til homogenatet ved CYP3A4-korrigeringsmetodene.

3.3.2 Små biopsier

Mikrosomfraksjon

Aktiviteten av CYP3A4 ble, i tillegg til de større biopsiene, også påvist i mindre biopsier (9-23 mg). Her ble kun Dounce-homogenisering benyttet på grunn av liten mengde vev. Det ble påvist enzymaktivitet i alle biopsiene. Dannelsen av metabolitten 1'-OH-MDZ økte med økende mengde MDZ konsentrasjon (Figur 21). Også her følger kurveforløpet Michaelis-Menten lignende kinetikk, men ligningen for substrathemming ga best tilpasning.



Figur 21. Hastighetskurver for dannelsen av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for to individuelle forsøk A og B i HIM isolert ved Dounce-homogenisator. Ikke-lineær regresjon ved bruk av ligning som beskriver substrathemming ga best tilpasning. Forsøk A og B er forsøk 1 og 2 (Tabell 10).

Estimerte enzymkinetiske parametre i HIM er vist i tabell 10. K_m -verdiene var lignende for begge forsøkene. V_{max} -verdiene ved protein korrigering var 60 og 73 pmol 1'-OH-MDZ/min/mg protein, dette ga CL_{int} -verdier på 30 og 42 µl/min/mg protein. Ved korrigering for CYP3A4 ble verdiene lavere både for V_{max} og CL_{int} , men verdiene var fortsatt lignende for begge forsøkene (Tabell 10).

Tabell 10. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelsen av 1'-OH-MDZ i HIM ved bruk av Dounce-homogenisator i 2 individuelle forsøk.

HIM forsøk	K_m (µM)	V_{max}^1 (pmol/min/ mg protein)	V_{max}^2 (pmol/min /pmol)	CL_{int}^1 (µl/min/mg protein)	CL_{int}^2 (µl/min/pmol)	Tilpasning	r^2
1	2,0	60	0,6	30	0,3	S.I	0,98
2	1,7	73	0,8	42	0,5	S.I	0,99

1: per mg protein

2: per pmol CYP3A4

Homogenat

Hastighetskurvene for tre individuelle forsøk i homogenat viste hvordan dannelsen av metabolitten 1'-OH-MDZ økte med økende MDZ konsentrasjon (Figur 22) i et Michaelis-Menten lignende forløp. For forsøk 3 ga ligningen som beskriver substrathemming best tilpasning.

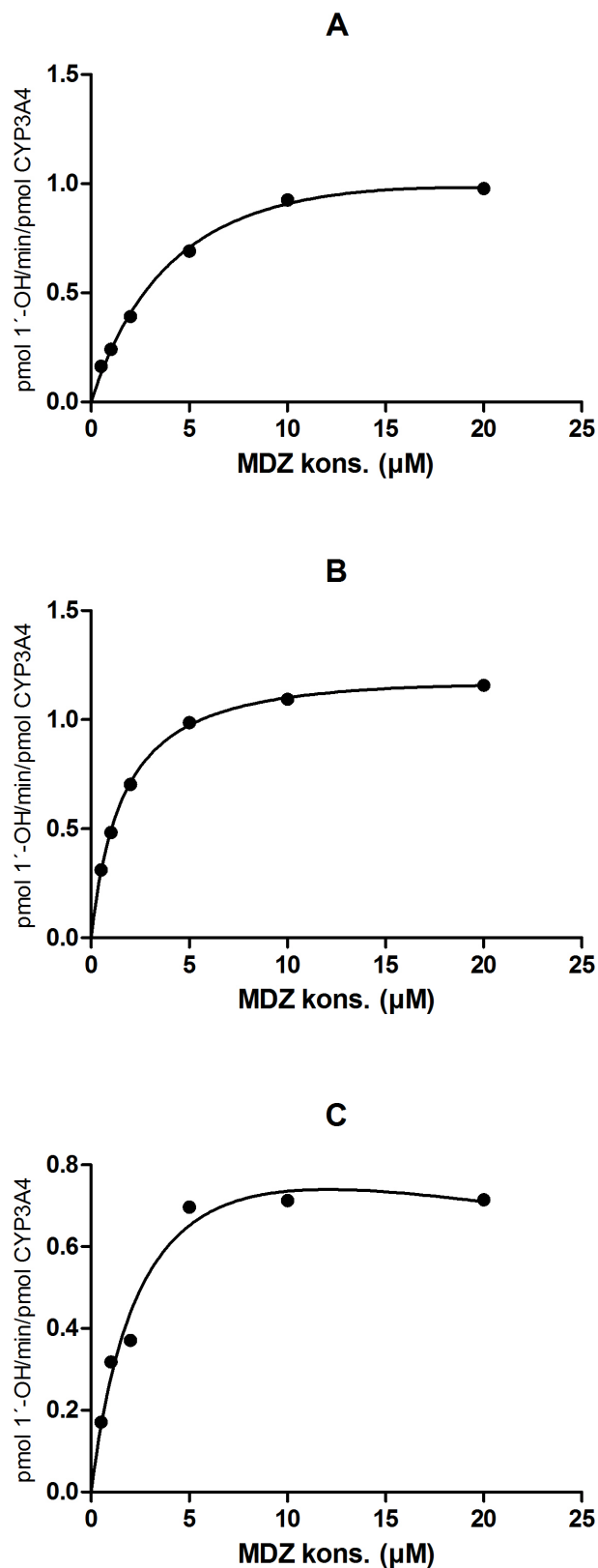
Estimerte enzymkinetiske parametre er vist i tabell 11 for de tre individuelle metabolisme forsøkene i homogenater. K_m -verdiene lå i intervallet 1,6-3,7 μM . V_{\max} -verdiene ved korrigering for protein er 7-12 pmol 1'-OH-MDZ/min/mg protein, dette ga CL_{int} -verdier på 2,3-5,2 $\mu\text{l/min/mg}$ protein. Ved korrigering for CYP3A4 ble verdiene for V_{\max} og CL_{int} lavere, men verdiene var fortsatt lignende for de 3 forsøkene (Tabell 11).

Tabell 11. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelse av 1'-OH-MDZ i intestinalt homogenat ved bruk av Dounce-homogenisator i 3 individuelle forsøk.

Homogenat forsøk	K_m (μM)	V_{\max}^1 (pmol/min/ mg protein)	V_{\max}^2 (pmol/min /pmol)	CL_{int}^1 ($\mu\text{l/min/mg}$ protein)	CL_{int}^2 ($\mu\text{l/min/pmol}$)	Tilpasning	r^2
1	3,7	12	1,2	3,3	0,3	M.M	0,99
2	1,6	8	1,3	5,2	0,8	M.M	0,99
3	2,9	7	1,1	2,3	0,4	S.I	0,97

1: per mg protein

2: per pmol CYP3A4



Figur 22. Hastighetskurver for dannelse av 1'-OH-MDZ som funksjon av MDZ konsentrasjon for tre individuelle forsøk A, B og C i homogenat isolert ved Dounce-homogenisator. Ikke-lineær regresjon ga best tilpasning. For forsøk 1 og 2 ga ligningen som beskriver substrathemming best tilpasning. Forsøk A-C er forsøk 1-3 (Tabell 12).

Homogenat og mikrosomfraksjon sammenlignet

CYP3A4-aktivitet i homogenater og mikrosomfraksjoner fra små biopsier, homogenisert med Dounce-homogenisator, ble sammenlignet ved protein- og CYP3A4-korrigerings i snittkurver (Figur 23). Ved protein korrigerings ser man en 10 ganger høyere spesifikk aktivitet, som antyder en anrikning av CYP3A4 i mikrosomfraksjonen i forhold til homogenatet (Figur 23 A). Ved CYP3A4-korrigerings ble det derimot høyere aktivitet i homogenatet istedenfor i mikrosomfraksjonene (Figur 23 B).

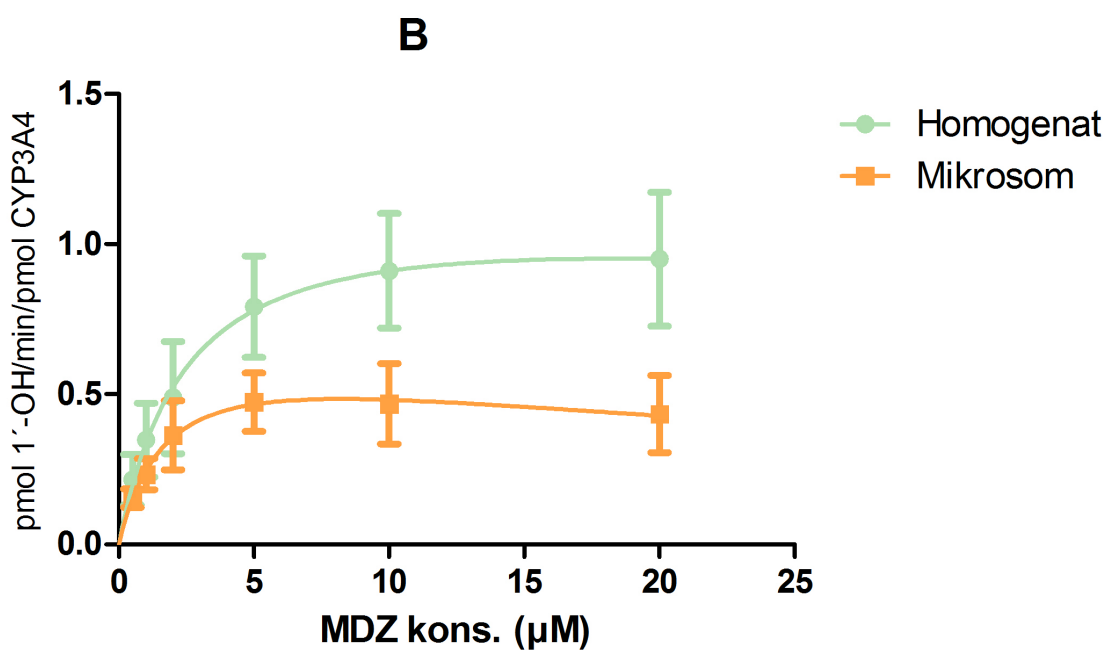
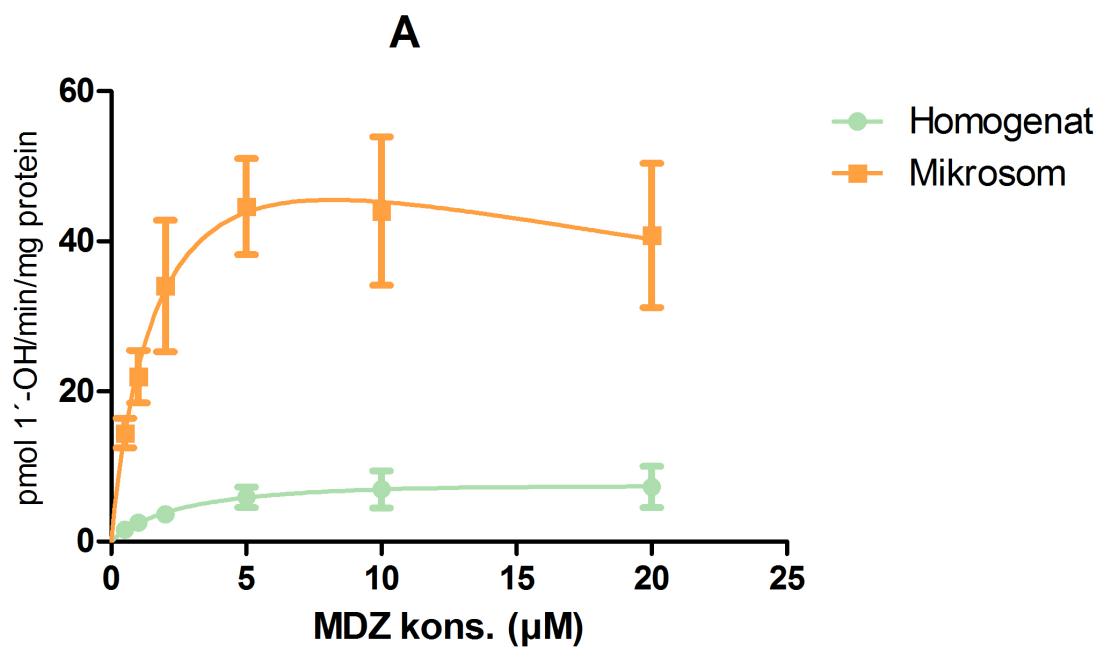
De estimerte enzymkinetiske parametrene for forsøkene gjort med homogenat og mikrosomfraksjoner er vist i snitt i tabell 12. Ut ifra snittverdiene til parametrene kan man se at det er stor forskjell i de ulike løsningene ved protein korrigerings, mens det for korrigerings for CYP3A4 er minimal forskjell.

Tabell 12. Estimerte enzymkinetiske parametre for CYP3A4-aktivitet for dannelse av 1'-OH-MDZ i intestinalt homogenat og mikrosomfraksjon ved bruk av Dounce-homogenisator (snitt \pm SD).

Mikrosom-fraksjon og homogenat	K_m (μM)	V_{max}^1 (pmol/min/mg protein)	V_{max}^2 (pmol/min/pmol)	CL_{int}^1 ($\mu l/min/mg$ protein)	CL_{int}^2 ($\mu l/min/pmol$)
Mikrosom-fraksjon (N = 2)	$1,9 \pm 0,2$	66 ± 9	$0,7 \pm 0,1$	36 ± 8	$0,4 \pm 0,1$
Homogenat (N = 3)	$2,7 \pm 1,1$	$9,1 \pm 2,8$	$1,2 \pm 0,1$	$3,6 \pm 1,5$	$0,5 \pm 0,3$

1: per mg protein

2: per pmol CYP3A4



Figur 23. Sammenligning av homogenater (N = 3) med mikrosomfraksjoner (N = 2) ved bruk av Dounce-homogenisator i snittkurver. Figur A viser protein korrigering, mens figur B viser CYP3A4-korrigering. Figurene viser at det er en anrikning av CYP3A4 i mikrosomene i forhold til homogenatet ved protein korrigering.

4 DISKUSJON

Det er i denne oppgaven utviklet metoder for å preparere mikrosomer fra små og store tarmbiopsier fra en sykkelig overvektig pasient, til *ex vivo* fenotyping av CYP3A4-aktivitet ved bruk av MDZ som probe. Metabolismeforsøk i mikrosomfraksjoner fra store biopsier (200-500 mg) dannet ved Potter-Elvehjem- og Dounce-homogenisator viste at mikrosomfraksjonene hadde tilsvarende evne til å metabolisere MDZ. Det samme gjaldt for metabolismeforsøk i homogenat fra store biopsier preparert ved begge homogeniseringsmetodene. De estimerte enzymkinetiske parametrene for mikrosom-fraksjonene dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator hadde imidlertid lavere interdag-variabilitet (Figur 17) enn tilsvarende verdier for mikrosomfraksjonene dannet ved Dounce-homogenisator, og Potter-Elvehjem-homogenisator er derfor å foretrekke ved preparering av mikrosomer fra store biopsier. Når det gjelder de små biopsiene (9-23 mg) kan kun Dounce-homogenisator benyttes av praktiske årsaker, men metabolismen av MDZ i homogenat dannet fra små biopsier ved denne metoden viste tilsvarende CYP3A4-aktivitet som homogenat fra store biopsier.

Basert på tidligere arbeid i vår forskningsgruppe ble Potter-Elvehjem- og Dounce-homogenisator valgt som metoder for homogenisering av biopsier som skulle testes [57, 58]. De to homogeniseringsmetodene ble i denne oppgaven sammenlignet for homogenisering av store biopsier. Potter-Elvehjem er en foretrukket metode til bruk ved homogenisering og videre subcellulær fraksjonering til mikrosomfraksjon på grunn av liten variabilitet i dataene i forhold til Dounce-metoden. Potter-Elvehjem-homogenisator er en anerkjent metode til homogenisering av biopsier for videre isolering av mikrosomer til bruk i metabolismestudier, og dette er en standardisert metode som i stor grad har blitt anvendt i flere studier av CYP3A4-aktivitet *in vitro* og *ex vivo* [1, 22, 30, 64-66]. Når det gjelder de små biopsiene ble Dounce-homogenisator benyttet på grunn av liten mengde vev, som vanskeliggjorde bruk av teflon-pistill både med tanke på væskevolumet som kreves og størrelsen og formen på pistillen. Dette er i samsvar med Pinto *et al.* som også har anvendt Dounce-homogenisator ved homogenisering av små biopsibiter [67].

Begge homogeniseringsmetodene ga som nevnt mikrosomfraksjoner med lignende evne til å metabolisere MDZ. Mengde 1'-OH-MDZ økte med økende konsentrasjon av MDZ ved et

Michaelis-Menten lignende forløp. Når det gjelder enzymkinetiske parametre var K_m -verdiene noe høyere i HIM dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator (4,2-5,7 μM) enn for HIM dannet ved Dounce-homogenisator (1,3-4 μM). Verdiene funnet for de to metodene var i samsvar med K_m -verdier funnet for HLM, oppsummert i litteraturen (1,4-14 μM) [68]. I tillegg er lignende K_m -verdier funnet for transfekterte humane leverepitel (THLE)-celler ($5,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$) [60]. I en studie utført av Galetin *et al.* ble CYP3A4-aktiviteten studert i HIM ved bruk av MDZ som probe, men metoden som ble benyttet for å lage mikrosomene er ikke oppgitt [26]. Her ble det brukt sammenslåtte ("pooled") mikrosomer fra ti pasienter, mens det i denne oppgaven ble benyttet HIM fra en pasient. K_m -verdiene som ble funnet av Galetin *et al.* var 2,5 ganger høyere enn verdiene funnet i mikrosomfraksjonene dannet ved både Dounce- og Potter-Elvehjem-homogenisator i denne oppgaven [26]. Noe av årsaken til forskjellen i K_m -verdiene kan være at Galetin *et al.* har korrigert for $f_{u(\text{mic})}$ i mikrosomløsningene [26]. $f_{u(\text{mic})}$ beskriver den ubundne legemiddel-fraksjonen i mikrosomløsningene. Samtidig var K_m -verdien funnet i denne oppgaven i samsvar med Paine *et al.*, som har studert CYP3A-aktiviteten i individuelle HIM fra jejunum fra femten pasienter ved bruk av MDZ som probe [22]. I studien til Paine *et al.* ble det funnet en gjennomsnittlig V_{max} -verdi på 426 pmol/min/mg protein med en range på 50-900 pmol/min/mg protein, og dette viser stor interindividuell variabilitet i CYP3A4-aktivitet [22]. Sammenlignet med HIM laget ved Potter-Elvehjem-homogenisator fra store biopsier i denne oppgaven er V_{max} -verdiene lignende den gjennomsnittlige V_{max} -verdien til Paine *et al.* [22].

Selv om de to homogeniseringsmetodene ga noe ulike K_m -verdier, ga begge metodene lignende CL_{int} -verdier i mikrosomfraksjon isolert fra store biopsier. CL_{int} -verdiene beregnet for de to metodene, korrigert for CYP3A4, var i samme område som Galetin *et al.*, men verdiene var 4 ganger høyere enn de verdiene som ble funnet i denne oppgaven [26]. CL_{int} -verdiene, korrigert for protein, var i samsvar med både Paine *et al.* og Galetin *et al.* [22, 26]. Samtidig har Bruyère *et al.* funnet CL_{int} -verdier, korrigert for protein i mikrosomfraksjon dannet ved Potter-Elvehjem, til å være 6,5 ganger lavere enn det som er funnet i denne oppgaven [1]. I tillegg har Kadono *et al.* rapportert CL_{int} -verdier, korrigert for protein i mikrosomfraksjon, til å være 15 ganger høyere enn det som ble funnet i denne oppgaven [69]. Denne betydelige variabiliteten i CL_{int} -verdiene funnet i HIM illustrerer interindividuell variasjon i CYP3A4-aktivitet i tarm [22].

CYP3A4-aktiviteten ble også direkte bestemt i homogenatene, uten subcellulær fraksjonering. Subcellulær fraksjonering av vev til mikrosomer fører til en høyere spesifikk aktivitet i mikrosomfraksjonene i forhold til i homogenatene. Den spesifikke aktiviteten til CYP3A4 var 6 ganger høyere for mikrosomfraksjonene enn for homogenatet for både Dounce- og Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetodene ved korrigering for CYP3A4 i de store biopsiene (Figur 20). I de små biopsiene var det 10 ganger høyere spesifikk aktivitet i mikrosomfraksjonene i forhold til homogenatene ved protein korrigering (Figur 23). Dette tyder på en anrikning i mikrosomfraksjonen i forhold til homogenatet for de store biopsiene, ved korrigering for CYP3A4 og totalprotein, og i de små biopsiene, ved korrigering for totalprotein. I homogenater homogenisert fra store biopsier var det større variasjon mellom forsøkene i de estimerte enzymkinetiske parametrene ved korrigering for totalprotein, enn ved korrigering for CYP3A4. Stor variasjon i V_{\max} , korrigert for totalprotein, ble også sett hos Pinto *et al.*, som undersøkte CYP3A4-aktivitet i tarmbiopsier ved bruk av homogenater laget med Dounce-homogenisator [67]. Gjennomsnittet av V_{\max} -verdiene for dannelse av 1'-OH-MDZ, korrigert for totalprotein var 446 pmol/min/mg protein, men hadde en variasjon på 200-800 pmol/min/mg protein [67]. Dette er lignende V_{\max} -verdier funnet i homogenater korrigert for protein i denne oppgaven. McConn *et al.* har også benyttet homogenater for å studere CYP3A4-aktiviteten i tarmbiopsier, og Potter-Elvehjem ble brukt som homogenisator [66]. Homogenater fra 20 pasienter viste en gjennomsnittlig V_{\max} -verdi for dannelse av MDZ metabolitter, korrigert for protein, som var halvparten av den gjennomsnittlige V_{\max} -verdien, i homogenater korrigert for protein, funnet i denne oppgaven. Imidlertid, ved korrigering for CYP3A4, ble V_{\max} -snittverdien til McConn *et al.* $3,8 \pm 1,2$ pmol/min/pmol CYP3A4 [66]. Dette er i samsvar med V_{\max} -verdier funnet i denne oppgaven ved korrigering for CYP3A4 i homogenater, dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator. Siden dataene ble lignende ved korrigering for CYP3A4, forsterker dette betydningen av å korrigere dataene for CYP3A4, istedenfor totalprotein når homogenater blir brukt for å studere CYP3A4-aktiviteten i tarmbiopsier.

Også i de små biopsiene var variasjonen mellom homogenater og mikrosomfraksjoner mindre ved korrigering av metabolismehastighet for CYP3A4. Dette tyder følgelig på at man får et godt bilde av CYP3A4-aktiviteten ved studier i homogenater fra små biopsier ved korrigering for CYP3A4. Bruk av homogenat istedenfor mikrosomfraksjon, vil kunne forenkle metoden ved at man unngår differensialsentrifugering i prøveoppbeidelsen. I tillegg er kvanti-

fiseringen av 1'-OH-MDZ dannet i mikrosomfraksjoner fra de små biopsiene begrenset på bakgrunn av lavt utbytte av mikrosomer ved subcellulær fraksjonering av et homogenat.

For å kunne gjøre *in vitro-in vivo* -korrelasjoner er det av interesse å finne sammenhengen mellom uttrykket av CYP3A4 i forhold til totalprotein i homogenater og mikrosomfraksjoner isolert fra tarmbiopsier. I denne oppgaven var det en variasjon på 6-139 pmol CYP3A4/mg protein i homogenatene, mens det i mikrosomfraksjonene var en variasjon på 11-99 pmol CYP3A4/mg protein, preparert fra biopsier fra en pasient. Verdiene er i samsvar med von Richter *et al.* som fant en variasjon på 19-174 pmol CYP3A4/mg protein for 15 individuelle homogenater [10]. Paine *et al.* fant også en variasjon på 2-98 pmol CYP3A4/mg protein i mikrosomfraksjoner fra jejunum i seks pasienter [22]. Dette er verdier som er i samme størrelsesorden med det som er funnet i denne oppgaven.

Mange legemidler vil følge Michaelis-Menten forløp *in vitro*, men for noen legemidler er den kinetiske profilen bedre beskrevet ved atypisk kinetikk. De observerte kurveforløpene til de ulike forsøkene viste Michaelis-Menten lignende kinetikk, men flere av dataene fikk best tilpasning ved bruk av ligningen som beskriver substrathemming. Noen av dataene viste best tilpasning ved Michaelis-Menten ligningen. Denne observerte atypiske kinetikken blir ofte observert *in vitro*, og metabolismestudier utført i supersomer har vist substrathemming for dannelse av 1'-OH-MDZ [60, 70]. Galetin *et al.* har også observert substrathemmingsforløp i HIM ved høye konsentrasjoner av MDZ [26]. Dette kan tyde på at substrathemmingen er et *in vitro* fenomen, som blir observert ved høye konsentrasjoner av MDZ.

MDZ er en anerkjent probe for testing av CYP3A4-aktivitet *in vitro* [49]. I denne metoden ble MDZ brukt som probe for å studere CYP3A4-aktiviteten i tarm. Andre studier som har undersøkt CYP3A4-aktiviteten har brukt prober som verapamil og testosteron, som også metaboliseres via CYP3A4 [10, 64, 67]. På grunn av at studiene har brukt andre prober for å studere CYP3A4-aktivitet, kan ikke dataene sammenlignes. Metodene som har blitt benyttet til homogenisering i disse artiklene er Potter-Elvehjem-homogenisator.

CYP3A4 er det CYP-isoenzymet som i størst grad er uttrykt i tarm og lever [15]. Samtidig er det dette enzymet som utviser store inter- og intraindividuelle forskjeller i den orale biotilgjengeligheten av ulike CYP3A-substrater [22, 49]. Metabolisme i tarm bidrar til den lave biotilgjengeligheten av mange CYP3A-substrater, som for eksempel MDZ [67]. Det er

nylig oppdaget en invers sammenheng mellom BMI og uttrykk av CYP3A4 i tarm og lever hos pasienter med sykelig overvekt, og det ble også funnet en invers sammenheng mellom BMI og oral clearance av atorvastatin lakton i disse pasientene [35]. For videre studier er det interessant å undersøke om det er en korrelasjon mellom uttrykk og aktivitet av CYP3A4 i humane intestinale mikrosomer. I litteraturen er mesteparten av metabolismestudier med MDZ som CYP3A4-probe utført i HLM, hvor det er vanlig å benytte ”pooled” HLM. Grunnen til dette er fordi ”pooled” mikrosomer er kommersielt tilgjengelig. For å kunne studere korrelasjonen mellom CYP3A4-aktiviteten og –uttrykket bør dette studeres i den enkelte pasient istedenfor å bruke ”pooled” mikrosomer. På denne måten kan også den enkelte pasients CYP3A4-aktivitet studeres i forhold til farmakokinetikken til ulike legemidler. Metoden som er utviklet i denne oppgaven til undersøkelse av CYP3A4-aktivitet i individuelle HIM skal brukes videre i en ny studie i pasienter med ulik grad av overvekt, fra normal BMI til sykelig overvekt ($\text{BMI} > 40 \text{ kg/m}^2$).

Siden begge homogeniseringsmetodene ga mikrosomfraksjoner og homogenater med lignende evne til å metabolisere MDZ kan begge metodene benyttes til å homogenisere de store biopsiene. Som tidligere nevnt ble det sett en høyere spesifikk aktivitet i mikrosomfraksjonene enn i homogenat i de store biopsiene, og denne vil derfor være best egnet til å studere CYP3A4-aktiviteten. Ved homogenisering av små biopsier (9-23 mg) bør Dounce-homogenisator benyttes. Ved sammenligning av CYP3A4-aktivitet innad i en pasient, hvor størrelsen på biopsier kan variere, bør Dounce-homogenisator brukes og sammenligningen av CYP3A4-aktiviteten bør således gjøres i homogenat, da det er vanskelig å studere CYP3A4-aktiviteten i mikrosomfraksjoner fra de små biopsiene.

5 KONKLUSJON

Det er utviklet metoder for homogenisering av tarmbiopsier fra en sykelig overvektig pasient og etterfølgende subcellulær fraksjonering med isolering av mikrosomfraksjoner, for måling av CYP3A4-aktivitet i disse. Dounce- og Potter-Elvehjem-homogeniseringsmetodene ga mikrosomfraksjoner med tilsvarende CL_{int} -verdier, og homogenater fra de to metodene viste tilsvarende evne til å metabolisere MDZ. Mikrosomfraksjonene ga høyere CL_{int} -verdier for metabolisme av MDZ, og disse vil være best egnet til å studere CYP3A4-aktiviteten i studier med tilgang på store biopsier. Ved homogenisering av små biopsier må Dounce-homogenisator benyttes, og CYP3A4-aktivitet bør bestemmes direkte i homogenat. I kliniske studier, hvor CYP3A4-aktiviteten skal sammenlignes i små og store biopsier er det da hensiktsmessig å benytte homogenater dannet ved Dounce-homogenisator.

Litteraturliste

1. Bruyere, A., et al., *Effect of variations in the amounts of P-glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2) and CYP3A4 along the human small intestine on PBPK models for predicting intestinal first pass*. Mol Pharm, 2010. **7**(5): p. 1596-607.
2. Rowland, M. and T.N. Tozer, *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 4 ed. 2011: Baltimore, Williams & Wilkins.
3. Buxton Io, B.L.Z., *Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2011, [New York]: McGraw-Hill Medical.
4. Rang, H.P. and M.M. Dale, *Pharmacology*. 6. ed. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone
5. Klaassen, C.D.W., J. B., *Casarett and doull's essentials of toxicology*. 2003, The McGraw-Hill Companies, Inc. United states of America.
6. Gonzalez Fj, C.M.T.R.H., *Drug metabolism in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2011, [New York]: McGraw-Hill Medical.
7. Giacomini Km, S.Y., *Membrane transporters and drug response in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2011, [New York]: McGraw-Hill Medical.
8. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
9. Vasilou, V., K. Vasilou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. Hum Genomics, 2009. **3**(3): p. 281-90.
10. von Richter, O., et al., *Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **75**(3): p. 172-83.
11. He, L., K. Vasilou, and D.W. Nebert, *Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily*. Hum Genomics, 2009. **3**(2): p. 195-206.
12. Lau, Y.Y., et al., *effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(2): p. 194-204.
13. Lin, J.H. and A.Y. Lu, *Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 535-67.
14. Lewis, D.F.V., *57 varieties: the human cytochromes P450*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(3): p. 305-318.
15. Paine, M.F., et al., *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(5): p. 880-6.
16. Shimada, T., et al., *Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome-P-450 Enzymes Involved in the Oxidation of Drugs, Carcinogens and Toxic-Chemicals - Studies with Liver-Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1994. **270**(1): p. 414-423.
17. Barter, Z.E., et al., *Determination of a quantitative relationship between hepatic CYP3A5*1/*3 and CYP3A4 expression for use in the prediction of metabolic clearance in virtual populations*. Biopharm Drug Dispos, 2010. **31**(8-9): p. 516-32.
18. Lin, J.H. and A.Y. Lu, *Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 1998. **35**(5): p. 361-90.
19. Kuehl, P., et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 383-91.

20. Guengerich, F.P., *Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 1-17.
21. Lamba, J.K., et al., *Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(10): p. 1271-94.
22. Paine, M.F., et al., *Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(3): p. 1552-62.
23. Lown, K.S., et al., *Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test*. Drug Metab Dispos, 1994. **22**(6): p. 947-55.
24. Hebert, M.F., *Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **27**(2-3): p. 201-214.
25. Gertz, M., et al., *Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(7): p. 1147-58.
26. Galetin, A. and J.B. Houston, *Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 1220-9.
27. Ozdemir, V., et al., *Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method*. Pharmacogenetics, 2000. **10**(5): p. 373-88.
28. Lamba, V., et al., *Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **332**(3): p. 1088-99.
29. Elens, L., et al., *CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy*. Pharmacogenomics, 2013. **14**(1): p. 47-62.
30. Lin, Y.S., et al., *Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 162-72.
31. Zhou, S.F., J.P. Liu, and B. Chowbay, *Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact*. Drug Metab Rev, 2009. **41**(2): p. 89-295.
32. Laforest, L., et al., *CYP2D6 gene polymorphism in caucasian smokers: lung cancer susceptibility and phenotype-genotype relationships*. Eur J Cancer, 2000. **36**(14): p. 1825-32.
33. Chou, W.H., et al., *Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness*. J Clin Psychopharmacol, 2000. **20**(2): p. 246-51.
34. Relling Mv, G.K.M., *Pharmacogenetics in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2011, [New York]: McGraw-Hill Medical.
35. Ulvestad, M., et al., *Impact of OATP1B1, MDR1, and CYP3A4 expression in liver and intestine on interpatient pharmacokinetic variability of atorvastatin in obese subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **93**(3): p. 275-82.
36. Christensen, H. and M. Hermann, *Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 8.
37. Korzekwa, K.R., et al., *Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites*. Biochemistry, 1998. **37**(12): p. 4137-47.
38. Tracy, T.S. and M.A. Hummel, *Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 231-42.
39. Hutzler, J.M. and T.S. Tracy, *Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(4): p. 355-62.

40. Houston, J.B. and K.E. Kenworthy, *In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(3): p. 246-54.
41. Jones, H.M. and J.B. Houston, *Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(9): p. 973-82.
42. Houston, J.B. and A. Galetin, *Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(2): p. 351-60.
43. Ito, K., et al., *Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 461-99.
44. Baranczewski, P., et al., *Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development*. Pharmacol Rep, 2006. **58**(4): p. 453-72.
45. Brandon, E.F., et al., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 233-46.
46. Tingle, M.D. and N.A. Helsby, *Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies?* Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006. **21**(2): p. 184-190.
47. Norsk legemiddelhåndbok. 03.03.2014 9.05.2013]; [siteret 20.02.14] Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/80914?expand=1>.
48. Mihic S, H.R., *Hypnotics and sedatives in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2011, [New York]: McGraw-Hill Medical.
49. Paine, M.F., et al., *First-pass metabolism of midazolam by the human intestine[ast]*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **60**(1): p. 14-24.
50. Chung, E., et al., *Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes*. Clin Pharmacol Ther, 2006. **79**(4): p. 350-61.
51. Link, B., et al., *Determination of midazolam and its hydroxy metabolites in human plasma and oral fluid by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(9): p. 1531-40.
52. Dey, P.M. and J.B. Harborne, *Plant Biochemistry*. 1997, Great Britain by Bath Press, Bath: Academic Press, Inc.
53. Graham, J., *Sentrifugation, A practical approach*. 2 ed. 1984, Oxford, England: IRL Press Limited.
54. Verollet, R., *A major step towards efficient sample preparation with bead-beating*. Biotechniques, 2008. **44**(6): p. 832-3.
55. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2 ed. 2010: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
56. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
57. Nordeng, M., *Uttrykket av P-glykoprotein i tarm og lever hos gastrisk bypass pasienter: Sammenhengen mellom uttrykket av P-glykoprotein og biotilgjengeligheten av atorvastatin*. 2011, Universitetet i Oslo.
58. Hermann, M., et al., *Evaluation of microsomal incubation conditions on CYP3A4-mediated metabolism of cyclosporine A by a statistical experimental design*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(3): p. 265-71.

59. Skottheim, I.B., et al., *Significant increase in systemic exposure of atorvastatin after biliopancreatic diversion with duodenal switch*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(6): p. 699-705.
60. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(3): p. 261-8.
61. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
62. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
63. Jensen, E.C., *The basics of western blotting*. Anat Rec (Hoboken), 2012. **295**(3): p. 369-71.
64. Obach, R.S., et al., *Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(3): p. 347-52.
65. Dostalek, M., et al., *Significantly reduced cytochrome P450 3A4 expression and activity in liver from humans with diabetes mellitus*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(5): p. 937-47.
66. McConn, D.J., 2nd, et al., *Reduced duodenal cytochrome P450 3A protein expression and catalytic activity in patients with cirrhosis*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(4): p. 387-93.
67. Pinto, A.G., et al., *Diltiazem inhibits human intestinal cytochrome P450 3A (CYP3A) activity in vivo without altering the expression of intestinal mRNA or protein*. Br J Clin Pharmacol, 2005. **59**(4): p. 440-6.
68. Proctor, N.J., G.T. Tucker, and A. Rostami-Hodjegan, *Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: intersystem extrapolation factors*. Xenobiotica, 2004. **34**(2): p. 151-78.
69. Kadono, K., et al., *Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(7): p. 1230-7.
70. Emoto, C. and K. Iwasaki, *Enzymatic characteristics of CYP3A5 and CYP3A4: a comparison of in vitro kinetic and drug-drug interaction patterns*. Xenobiotica, 2006. **36**(2-3): p. 219-33.

Appendiks

Poster - Norsk selskap for Farmakologi og Toksikologi (NFST), Vintermøte Beitostølen 2014

CYP3A4-aktivitet *ex vivo* i individuelle humane intestinale mikrosomer

Lilleengen A¹, Lunde I¹, Sandbu R², Åsberg A¹, Christensen H¹

¹Avdeling for farmasøytisk bioteknologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, ²Senter for Sykelig Overvekt, Sentralsykehuset i Vestfold, Tønsberg



Bakgrunn

Cytokrom P450 (CYP) 3A4 er det kvantitativt viktigste CYP-enzymet i lever og tarm og er ansvarlig for metabolisme av over 50% av alle legemidler. Individuell variasjon i CYP3A4-uttrykk og -aktivitet fører til stor variasjon i systemisk legemiddeleksponering i pasienter. I sykkelig overvektige pasienter er det observert en invers sammenheng mellom body mass index (BMI) og uttrykk av CYP3A4

i tarm og lever¹. Mekanismen for dette er ikke klarlagt, men pasientenes inflammatoriske tilstand kan være involvert, siden cytokin-aktivitet har vært vist å føre til nedregulering av CYP3A4. Sykkelig overvektige pasienter kan derfor ha økt risiko for overdosering av legemidler, spesielt hvis det doseres per kg. I en ny studie skal dette undersøkes nærmere ved å studere CYP3A4-aktivitet i humane

intestinale mikrosomer (HIM) isolert fra tyntarm hos pasienter med ulik grad av overvekt. Hensikten med dette arbeidet er å utvikle en metode for isolering av mikrosomer fra tarmbiopsier. CYP3A4-aktiviteten skal bestemmes *ex vivo* i disse individuelle HIM ved bruk av midazolam (MDZ) som probe.

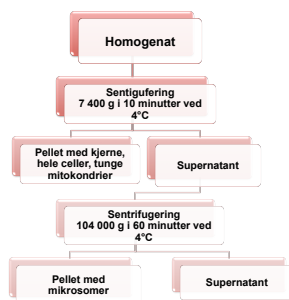
Metode

Prøveopparbeidelse:

Biopsier fra jejunum fra en pasient som gjennomgikk bariatrisk kirurgi (NCT 00331565) ble homogenisert med Potter-Elvehjem eller Dounce homogenisator. Homogenatet ble sentrifugert som illustrert i Figur 1. Den endelige pelleten, inneholdende mikrosomer, ble videre reløst i 0,25 M sukrose-buffert og fryst ned ved -70°C.

Metabolismeforsøk:

Mikrosomer fra de to homogeniseringsmetodene ble sammenlignet.



Figur 1. En illustrasjon av den trinnvise fraksjoneringen av homogenatet.

Prosedyre:

- 50 µl HIM (0,21-0,35 mg protein/ml) ble preinkubert ved 37°C i 118 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7,4), 0,5 mM MgSO₄ og 1,6 mM NADPH i 5-10 minutter.
- MDZ ble tilsatt i konsentrasjoner fra 0,5 til 20 µM, og prøvene ble inkubert i 7,5 minutter. Metabolismen ble terminert ved tilsetning av 150 µl iskald acetonitril og inkubering på is i 30 minutter.
- Mengde 1-hydroksimidazolam (1-OH MDZ) ble bestemt ved en validert LC-MS metode.
- Enzymkinetiske analyser ble utført ved hjelp av Graphpad Prism versjon 4.

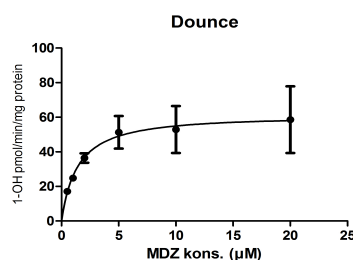
Resultater og Diskusjon

Det ble påvist CYP3A4 aktivitet i HIM ved bruk av både Potter-Elvehjem- og Dounce-homogenisering. Mengden 1-OH MDZ dannet i mikrosomene økte med økende konsentrasjon av MDZ ved Michaelis-Menten lignende forløp (Figur 2 og 3). Ikke-lineær regresjon ga best tilpasning ved bruk av ligning som beskriver substrathemming.

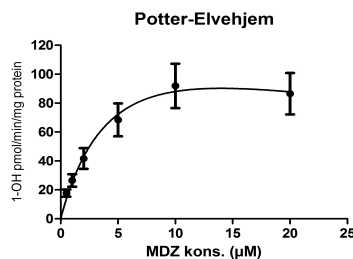
Estimerte enzymkinetiske parametere for dannelse av 1-OH MDZ ga tilsvarende intrinsic clearance (CL_{int}) for mikrosomer dannet med de to homogeniseringsmetodene (Tabell 1). Dette indikerer at de to metodene ga mikrosomer med lignende evne til å metabolisere MDZ. Mikrosomene dannet ved Potter-Elvehjem-homogenisator viste mindre variabilitet mellom forsøkene enn de som ble dannet ved Dounce-homogenisator. Dette tyder på en mer reproducerbar homogenisering ved bruk av Potter-Elvehjem metoden.

Tabell 1. Enzymkinetiske parametere for CYP3A4-aktivitet for dannelse av 1-OH MDZ i HIM.

HIM	K _m (µM)	V _{max} (pmol/min/mg protein)	CL _{int} (µl/min/mg protein)	r ²
Dounce (N=5)	2,3 ± 1,4	84,3 ± 38,2	43,4 ± 18,8	0,76-0,99
Potter-Elvehjem (N=4)	5,3 ± 0,8	162,5 ± 62,5	29,8 ± 8,9	0,98-0,99



Figur 2. Dannelse av 1-OH MDZ i mikrosomene ved økende MDZ konsentrasjon (snitt ± SEM). Dounce ble brukt som homogenisator, (N=5).



Figur 3. Dannelse av 1-OH MDZ i mikrosomene ved økende MDZ konsentrasjon (snitt ± SEM). Potter-Elvehjem ble brukt som homogenisator, (N=4).

Oppsummering

- En metode for isolering av mikrosomer fra tarmbiopsier ved homogenisering og subcellulær fraksjonering har blitt utviklet.
- Preliminære data tyder på at det er lavest variabilitet i CYP3A4-aktiviteten bestemt i HIM ved bruk av Potter-Elvehjem-homogenisator.